

Isolierung und Charakterisierung der Aminopeptidase I aus Bierhefe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GÜNTHER METZ
aus Walburg

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

Isolierung und Charakterisierung der Aminopeptidase I aus Bierhefe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GÜNTHER METZ

aus Walburg

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 9.6.1976

Tag der mündlichen Prüfung am 23. 6. 1976

Dekan: Prof. Dr. G. Schmid

Berichterstatter: Prof. Dr. Fr. Schneider

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider

im Physiologisch - chemischen Institut II der
Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Für die großzügige Förderung und viele anregende
Diskussionen danke ich Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider
und Herrn Dr. K.-H. Röhm.

Frau Dr. R. Marx danke ich für die Aufnahme
der elektronenmikroskopischen Bilder.

Für vorzügliche technische Assistenz danke ich
Herrn J. Henseling.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AG	L-Alanyl-glycin
AGG	L-Alanyl-glycyl-glycin
A- β -NA	L-Alanin- β -Naphtylamid
A-p-NA	L-Alanin-p-Nitroanilid
AP	Aminopeptidase
AS	L-Aminosäure
ATEE	N-Acetyl-L-Tyrosin-äthylester
BAEE	N ^{α} -Benzoyl-L-Arginin-äthylester
Boc-Peptide	N-t-Butyl-L-Peptide
Cys	L-Cystein
Den. Häm.	Denaturiertes Hämoglobin
DFP	Diisopropylphosphofluoridat
DTT	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Form-Peptide	N-Formyl-L-Peptide
GuaxHCl	Guanidin-Hydrochlorid
K.-H.	Kohlenhydrat
LAP	Leucinaminopeptidase
LG	L-Leucyl-Glycin
LGG	L-Leucyl-Glycyl-Glycin
L- β -NA	L-Leucin- β -Naphtylamid
L-p-NA	L-Leucin-p-Nitroanilid
MCA	β -Mercaptoäthanol
Me ²⁺	zweiwertige Metallionen
MG	Molekulargewicht
NEM	N-Äthylmaleinimid
PCMB	p-Chlormercuribenzoat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan
Z-Peptide	Benzyloxycarbonyl-L-Peptide

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Fragestellung	1
1.2. Proteolytische Enzyme der Hefe	2
1.3. Eigenschaften der Hefe-Proteasen: Tabellarische Beschreibung	10
1.4. Eigenschaften einiger ausgewählter Amino- peptidasen: Tabellarische Beschreibung	13
2. <u>Material und Methoden</u>	
2.1. Geräte	20
2.2. Chemikalien	22
2.3. Methoden	
2.3.1. Dünnschichtchromatographie	27
2.3.2. Qualitative und quantitative Aktivitäts- bestimmungen	28
2.3.3. Metallfreie Amino-peptidase I	29
2.3.4. Aktivierung durch Metall- und Halogenidionen	30
2.3.5. pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität und seiner Hitzestabilität, Einfluß von Aktivatoren	31
2.3.6. Stabilität des Enzyms in Abhängigkeit vom pH, Einfluß von Aktivatoren	32
2.3.7. Einfluß von Metallchelatoren	32
2.3.8. Modifizierungsreaktionen	32
2.3.9. Proteinbestimmung	33
2.3.10. Zink - Bestimmung	34
2.3.11. Zucker - Bestimmung	34
2.3.12. Disc-Elektrophoresen mit und ohne SDS	37
2.3.13. Isoelektrische Fokkussierung	38
2.3.14. Aminosäureanalysen	38
2.3.15. Dichtegradientenzentrifugationen	39
2.3.16. Kinetik	41
3. <u>Reinigung der Amino-peptidasen I und II aus Hefe</u>	
3.1. Amino-peptidase I	42
3.2. Amino-peptidase I nach GRASSMANN, modifiziert	45

3.3.	Aminopeptidase I nach JOHNSON	48
3.4.	Aminopeptidase II aus Bierhefe	49
4.	<u>Ergebnisse</u>	
4.1.	Reinigung der Aminopeptidase I	50
4.2.	Anreicherung der Aminopeptidase II aus Bierhefe	58
4.3.	Extinktionskoeffizient der AP I	64
4.4.	Reinheitsskriterien	64
4.5.	Aminosäurezusammensetzung des Enzyms	67
4.6.	Zucker-Gehalt der AP I	67
4.7.	Zink-Gehalt der AP I	70
4.8.	Molekulargewicht und Untereinheiten der AP I	70
4.8.1.	Dichtegradientenzentrifugationen	70
4.8.2.	Gelfiltration an Sepharose 6B und Dichtegradienten	79
4.8.3.	Polymorphismus des Enzyms bei der Rechromato- graphie an DEAE-Cellulose	83
4.8.4.	Polymorphismus des Enzyms bei der isoelektrischen Fokkussierung	85
4.8.5.	Elektronenmikroskopische Aufnahme des Enzyms	87
4.9.	Stabilität des Enzyms	88
4.10.	Katalytische Eigenschaften der AP I	
4.10.1.	Substratspezifität	91
4.10.2.	Einfluß von Effektoren auf die Enzymaktivität	95
4.10.3.	pH-Abhängigkeit des Enzyms, Einfluß von Aktivatoren	103
4.10.4.	Kinetik	105
4.11.	Chemische Modifizierung des Enzyms	110
5.	<u>Diskussion</u>	
5.1.	Vergleich der von GRASSMAN und JOHNSON beschriebenen Aminopeptidasen mit der AP I	112
5.2.	Enzymisolierungen	118
5.3.	Zuckergehalt des Enzyms	124
5.4.	Molekulargewicht und Untereinheiten der AP I	125

5.5.	Stabilität des Enzyms	130
5.6.	Zink-Gehalt des Enzyms	133
5.7.	Katalytische Eigenschaften des Enzyms	
5.7.1.	Einfluß von Effektoren auf die Aminopeptidaseaktivität	135
5.7.2.	pH-Abhängigkeit des Enzyms, Einfluß von Aktivatoren	139
5.7.3.	Substratspezifität und Kinetik	141
5.8.	Chemische Modifizierung des Enzyms	148
6.	<u>Zusammenfassung</u>	149
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	152

1. EINLEITUNG

1.1. Fragestellung

Aus den beiden Tabellen über die proteolytischen Enzyme der Hefe (Tabelle I) und über die Aminopeptidasen aus verschiedenen Organismen (Tabelle II) kann man ersehen, daß schon eine Vielzahl von N-terminalen Exopeptidasen gut untersucht sind, über Aminopeptidasen aus Hefe jedoch noch nicht allzuviel bekannt ist. Abgesehen von JOHNSONS (1,2-6) und MASUDAS (7) Aminopeptidasen aus Hefe sind die anderen bisher beschriebenen noch nicht in einheitlicher Form dargestellt worden. Bezüglich des von GRASSMANN und seinen Mitarbeitern (8-12,16) aus Bierhefe isolierten Enzyms gibt es widersprüchliche Aussagen über die Spaltung von Dipeptiden durch dieses Enzym und über die Aktivierbarkeit durch Chlorid und Hefekochsaft (11,12,17-20,59).

Auch bei JOHNSONS Aminopeptidase besteht noch Unklarheit über die Einheitlichkeit seiner Enzympräparation, da, wie er schreibt (1), Präparationen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten elektrophoretisch einheitlich sind. Das gleiche gilt für das Sedimentationsverhalten dieses Enzyms.

MATILE (21,22) interessierten die charakteristischen Eigenschaften der von ihm gefundenen Aminopeptidasen aus Hefe weniger als ihre Lokalisation, also ihr Wirkungsort in der Hefezelle und der Zusammenhang zwischen Peptidaseaktivität und Zellcyclus.

Über die genaue Funktion der Aminopeptidasen in der Hefezelle ist zur Zeit ebensowenig bekannt wie über mögliche Mechanismen ihrer Regulation und ihre Wirkung.

Wie das Beispiel der Hefeproteasen A, B und C (26-45) zeigt, muß man, um Aufschluß über die genannten Probleme zu bekommen, die Enzyme zunächst in möglichst reiner Form isolieren und charakterisieren.

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst, zu erfahren, wie sich die Aminopeptidaseaktivität der Hefezelle zusammensetzt, um dann die verschiedenen Aminopeptidasen zu trennen, anzureichern

und zu charakterisieren.

Wie sich herausstellte, ist der größte Teil der N-terminalen Exopeptidaseaktivität in der Hefezelle auf eine Amino-peptidase zurückzuführen, die ein sehr hohes Molekulargewicht aufweist und sehr stabil ist. Aus den erwähnten Gründen erschien es sinnvoll, zunächst das eben angeführte Enzym, das Amino-peptidase I genannt wurde, zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit der Isolierung, Reinigung und proteinchemischen Charakterisierung dieses Enzyms sowie einigen Untersuchungen zur Kinetik und Spezifität.

1.2. Proteolytische Enzyme der Hefe

1.2.1. _Geschichtlicher_Rückblick

Proteolytische Aktivität in der Hefe wurde von BUCHNER und HAHN (46) 1897 sowie von HAHN und GERET 1898 (47) entdeckt und beschrieben. Nach der Meinung von VINES (48) beruht die proteolytische Wirkung auf zwei Komponenten. Die eine bezeichnete er als "Peptase", sie sollte Proteine bis zur Peptonstufe spalten, die andere als "Ereptase". Die letztere sollte die gebildeten Peptone weiter bis zur letzten Stufe, den Aminosäuren, spalten.

Von DERNBY (49) wurde dann eine weitere Klassifizierung eingeführt. Er teilte die Hefeproteasen in drei Komponenten ein; in das "Hefepepsin", das Proteine bei "deutlich saurer Reaktion" in Peptone spaltet, das "Hefetrypsin", das bei pH 7 Peptone "weitgehend, wenn auch nicht vollständig, bis zu den Aminosäuren" aufspaltet, und das "Hefeerepsin", dessen pH-Abhängigkeit und Spezifität mit dem des "Pankreaserepsins" übereinstimmen sollte.

Alle diese Unterscheidungen wurden zu jener Zeit nur nach der Substratspezifität und den pH-Optima getroffen. Erst nachdem Methoden zur Auftrennung der proteolytischen Enzyme gefunden worden waren, konnte man sie auch näher klassifizieren und charakterisieren. Das geschah zunächst bei der Trennung der

Pankreasproteasen durch fraktionierte Adsorption an Tonerde, die von WALDSCHMIDT-LEITZ (50,51) 1925 durchgeführt wurde. Später trennten auch WILLSTÄTTER und GRASSMANN (8) die Hefeproteasen nach dieser Methode in eine "tryptische" und eine "ereptische" Komponente, von denen die letztere lediglich Dipeptide, aber keine Tripeptide und höhere Peptide spalten sollte (9,10). Dieses Enzym wurde Dipeptidase genannt. GRASSMANN erkannte damals, daß für die "spezifische Angreifbarkeit nicht allein die Natur der chemischen Bindung, sondern vielmehr auch die Natur und die Anzahl der benachbarten Aminosäure- und Peptidkomplexe ausschlaggebend sind". Mit der tryptischen Komponente seines Säuleneluates testete er verschiedene Substrate, und stellte fest, daß sowohl Proteine als auch Polypeptide gespalten wurden. Obwohl also in seinen Präparationen beide Aktivitäten gleichermaßen zu verzeichnen waren, vermutete GRASSMANN aus den jeweiligen pH-Optima der Aktivitäten (gegen Casein pH 5, gegen Leu-Gly-Gly pH 7), daß das tryptische und polypeptidspaltende Enzym der Hefe nicht identisch sind. Seine Vermutungen wurden bestärkt, als er entdeckte, daß sich bei verschiedenen gealterten Präparationen der Quotient aus den Aktivitäten gegenüber Leu-Gly-Gly und Casein verändert hatte. 1928 gelang es ihm dann auch, sein "Hefetrypsin" in eine "polypeptidspaltende und eine proteinspaltende Komponente" zu trennen (11,12). Er führte jetzt die proteolytische Wirkung der Hefe auf drei Enzyme zurück, nämlich auf eine Proteinase, auf die Hefepolypeptidase und die Hefedipeptidase. GRASSMANN prüfte eine Reihe synthetischer Peptide- und Derivate auf ihre Spaltbarkeit durch die Polypeptidase. Bei 40°C und pH 7,8 fand er eine Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeiten Ala-Gly-Gly Leu-Gly-Gly-Gly Leu-Gly-Gly Gly-Gly-Gly. Aus dieser Reihe folgerte er, daß die α -endständige Aminosäure abgespalten wird, da das Ende der Peptide immer von Gly-Gly gebildet wird. Aus dem Aciditätszuwachs bei der Spaltung von Leu-Gly-Gly-Gly schloß er auf eine symmetrische Spaltung in zwei Dipeptide. Wie er zuvor festgestellt hatte, wurden Dipeptide von der Polypeptidase nicht gespalten, hingegen jedoch Dipeptidamide und Dipeptidester. Er vermutete

aufgrund dieser Experimente, daß die "freie Carboxylgruppe in Nachbarstellung zur Peptidbindung den Angriff der Polypeptidase verhindert".

GRASSMANN konnte auch keine Aktivität seiner Polypeptidase gegenüber Proteinen feststellen. Er machte 1928 den Vorschlag, die Gruppe von Enzymen, die "intakte Eiweißkörper" anzugreifen vermögen, Proteinasen zu nennen, um sie von den Peptidasen abzugrenzen. Unter Peptidasen verstand er diejenigen "proteolytischen Fermente, von denen Wirkungen auf strukturechemisch bekannte Peptidsubstrate bekannt sind". Die Proteinase wurden zuvor in der Literatur als "Proteasen im engeren Sinne", "primäre Proteasen" oder "eigentliche Proteasen" bezeichnet.

GRASSMANN verglich die von ihm isolierte Proteinase mit dem Papain, da sie durch HCN und H_2S aktiviert wurde. Eine Aktivierung erfolgte ebenfalls beim Stehenlassen der Enzymlösung. Der "natürliche Aktivator" wird bei pH 5 zerstört.

Schon 1928 hatte GRASSMANN auch erkannt, daß er mit den bis dahin angewendeten Adsorptionsmethode keinen Fortschritt in bezug auf die Reinheit des "Hefe-Trypsins" mehr machen konnte. Daher untersuchte er das Autolyseverhalten der Hefe, womit er nach der Erkenntnis von WILLSTÄTTER (13) handelte: "Die Kunst der Darstellung von Enzymlösungen besteht darin, den besonderen Vorgang der Freilegung ... von anderen Abbauvorgängen bei der Hefeautolyse zu trennen und ihn allein so zu fördern, daß das Enzym vollständig in Lösung übergeht mit möglichst wenig Ballast von Begleitstoffen".

GRASSMANN bemerkte, daß während der Autolyse der pH der Hefesuspension, die Temperatur, die Verdünnung und die Autolyse-dauer von entscheidendem Einfluß waren. So konnte er bei der Autolyse bei pH 7 feststellen, daß nach 48 h der größte Teil der Proteinase in Lösung gegangen war. Durch Zentrifugieren und erneuter Autolyse der Hefe gelang es ihm, die Hefepolypeptidase gegenüber der Proteinase erheblich anzureichern und umgekehrt.

In der Zwischenzeit glückte es BALLS und KÖHLER (14,15) die

Aminopolypeptidase aus Hefe auf eine andere Weise anzureichern. Ihre Methode wurde 1934 wiederum von GRASSMANN und seinen Mitarbeitern (16) aufgegriffen und verbessert. Sie versetzten das Hefeautolysat mit Papain, was die Autolysezeit verminderte und die Ausbeute an Polypeptidase erhöhte. Anschließend fällten sie das Enzym durch Zusatz von 2 N Essigsäure bei pH 4,5-4,7. Durch eine gekoppelte Natriumacetat-Ammoniumsulfat-Fällung mit nachfolgender Dialyse wurde das Enzym dann noch weiter gereinigt. Auf diese Weise wurden spezifische Aktivitäten von ca. 180 U/mg Protein erreicht.

Erst 1941 nahmen SCHNEIDER und seine Mitarbeiter (17-20) die Aminopolypeptidase der Hefe wieder in Angriff. Sie entdeckten, daß das Enzym unter dem Zusatz von Chloridionen oder "Hefekochsaft" auch Dipeptide zu spalten vermag.

Im gleichen Jahr erschien von JOHNSON (1) eine Arbeit über eine Aminopolypeptidase aus Hefe, die er durch wiederholte Acetonfällungen etwa 1000-fach angereichert hatte, und die vom GRASSMANN'schen Enzym verschieden sein sollte (1-6). JOHNSON fand für sein Enzym ein Molekulargewicht von 670 000 daltons; das Enzym wird nach JOHNSON durch Chlorid-, Zinkionen und in geringerem Maße auch durch Cobaltionen aktiviert.

In der Folgezeit wurden neue Amino-peptidasen der Hefe in der Literatur nicht mehr erwähnt.

Erst 1966 berichtete TJEDER (52) von einer Naphtylamidase in Bäckerhefe, jedoch konnte er das Enzym nicht homogen erhalten und charakterisieren.

1967 beschrieb MATILE (21) das Vorkommen einer Amino-peptidase in den Vakuolen von *Saccharomyces cerevisiae*, 1971 (22) von vier verschiedenen Amino-peptidasen in Hefextrakten. Von diesen vier Enzymen soll eine in den Hefevakuolen lokalisiert sein. Eine Anreicherung des recht instabilen Enzyms wurde jedoch nicht versucht.

1975 berichteten MASUDA und Mitarbeiter (7) von zwei Amino-peptidasen der Hefe, die sie isolieren und charakterisieren konnten. Das größere der beiden Enzyme weist ein Molekulargewicht von 200 000, das kleinere eines von 34 000 daltons

auf. Das zuerst aufgeführte Enzym wurde von den Autoren Amino-
petidase I, das letztere Amino-
petidase II genannt.

Amino-
petidase I ist ein Metall- und ein SH-Enzym mit einem
Aktivitätsoptimum gegenüber Leu-Leu und Leucin-p- Nitro-
anilid bei pH 7,6.

Im Gegensatz zu den Amino-
petidase fanden die Protein-
asen und Carboxypeptidasen der Hefe in den letzten 20 Jahren
großes Interesse. So isolierte LENNEY (24) 2 Endopeptidasen,
die er Proteinase A und B nannte und die seiner Ansicht nach
mit den bereits 1917 von DERNBY (23) beschriebenen Enzymen
identisch sind. Die Proteinase A soll dem von HECHT und CIVIN
(25) beschriebenen "Hefe-Pepsin" entsprechen.

Ebenfalls im Jahre 1956 beschrieb FELIX (53,54) eine Carboxy-
peptidase aus Hefe. Die gleiche Arbeitsgruppe isolierte und
charakterisierte 1966 zwei weitere Proteasen aus Hefe, und
zwar eine metallabhängige Carboxypeptidase mit einer essen-
tiellen SH-Gruppe, die sie Peptidase α nannten, und eine
Peptidase β genannte Serin-Proteinase (55).

In den Jahren 1967-1969 beschrieben nochmals LENNEY und
DALBEC (26-28) die Protein-
asen A und B aus Hefe. Sie be-
richteten damals auch von dem Vorkommen einer Pro-Prote-
inase B.

Zu der gleichen Zeit begannen HATA, HAYASHI und Mitarbeiter
mit ihrer Arbeit über die Hefeproteasen, die sie in den
nächsten Jahren bis zur Homogenität reinigen und charak-
terisieren konnten (29-31). Auch sie fanden, daß die drei
Enzyme in der Hefe jeweils zum Teil als Pro-Proteasen vor-
liegen (32). 1968 gelang ihnen die Isolierung der Pro-Pro-
tease C, deren Aktivierung und andere Eigenschaften sie in
zwei Arbeiten beschrieben (33,34).

Wie sie 1970 feststellten, ist die Protease C eine Carboxy-
peptidase (35,36) mit Serin im aktiven Zentrum (37).

Dieses Enzym ist der von FELIX (53-55) beschriebenen Pepti-
dase in seinen Eigenschaften sehr ähnlich.

Das gleiche Enzym wurde auch nochmals 1974 von KUHN und Mit-
arbeitern sehr intensiv studiert (38).

In den letzten Jahren wurden die Proteasen A, B und C sowie deren inaktive Vorstufen von HOLZER und seinen Mitarbeitern eingehend untersucht. Es gelang ihnen auch, die spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme zu isolieren (39-45).

Die Hefedipeptidase ist ebenfalls schon sehr gut untersucht worden. 1927 wurde sie erstmals von GRASSMANN erwähnt (9-11). Auch in den Jahren danach fand sie noch reges Interesse (56-61). 1967 beschrieb CORDONNIER die Isolierung zweier Dipeptidasen aus Sacch. cer. , von denen eine eine Gly-Gly-Dipeptidase sein sollte (62).

Bei der Isolierung der Dipeptidasen fand CORDONNIER auch eine Aminopeptidase, die er aber nicht näher beschrieb. Eine hochgereinigte und elektrophoretisch einheitliche Dipeptidase aus Bierhefe wurde 1974 von RÖHM (63,64) dargestellt und charakterisiert.

1.2.2. Funktionen der intrazellulären Hefe-Proteasen

Wie bereits erwähnt, ist das Vorkommen von Proteasen in der Hefezelle schon lange bekannt. Über ihre Funktionen herrschte jedoch lange Zeit Unklarheit. Erst in den letzten 30 Jahren und speziell während des letzten Jahrzehnts wurde diesem Problem mehr Aufmerksamkeit gewidmet.

Während man früher die Zelle mit einer Maschine verglich, die von außen zugeführte Nährstoffe aufnimmt und verbrennt um Energie zu gewinnen, selbst jedoch nicht verstoffwechselt wird, wurde 1936 und 1942 erstmals entdeckt, daß die Enzyme der Zelle ebenfalls kontinuierlich ab- und aufgebaut werden (65). Heute weiß man, daß alle Proteine der Zelle dem Stoffwechsel unterliegen.

Der intrazelluläre Abbau von Proteinen wird durch Hydrolyse der Peptidbindungen mit Hilfe intrazellulärer Endo- und Exopeptidasen, die sich in ihrer Wirkung ergänzen, bewerkstelligt.

In den letzten Jahren hat man für die intrazellulären Pepti-

dasen mehrere Funktionen gefunden:

- a) Bereitstellung von Aminosäuren zur Proteinbiosynthese bei vermindertem Angebot oder erhöhtem Bedarf

In nichtwachsenden Bakterienzellen halten sich Abbau und Aufbau von Proteinen die Waage, wobei jedoch die Halbwertszeiten verschiedener Enzyme recht unterschiedlich sind. Man hat festgestellt, daß Enzyme mit Schlüsselstellungen im Stoffwechsel geringere Halbwertszeiten aufweisen als andere.

Durch die Tatsache, daß die intrazellulären Enzyme durch Proteasen abgebaut werden können, wird die Regulation ihrer Konzentrationen wesentlich vereinfacht, und zwar um so mehr, je geringer ihre Halbwertszeiten ist.

Die Konzentrationen intrazellulärer Proteine mit kleinen Halbwertszeiten können sich also schneller ändern, und die Zelle sich dadurch veränderten Stoffwechsellagen besser anpassen. Bei mangelnder Zufuhr von extrazellulären Aminosäuren zum Beispiel zeigen viele Zellen eine erhöhte Proteolysegeschwindigkeit. Dadurch können essentielle Aminosäuren zur Synthese von Enzymen, die bei dieser Stoffwechselsituation besonders benötigt werden (katabole Enzyme), bereitgestellt werden.

Nach SUSMAN und MATILE (66,22) ist die proteolytische Aktivität in der Hefezelle am größten, wenn sich diese in der stationären Phase befindet. Hier werden wahrscheinlich zusätzlich Aminosäuren zur Neusynthese von Proteinen bereitgestellt, die für die Sporulation benötigt werden.

- b) Abbau von anormalen oder für die Zelle toxischen Proteinen und Peptiden

Eine andere Aufgabe der Proteasen besteht im Abbau von anormalem Protein, das für die Zelle schädlich sein kann. So ist bewiesen, daß verschiedene Dipeptide und Tripeptide in die Zelle gelangen und dort das Zellwachstum hemmen können, wenn sie sich anhäufen und nicht durch intrazelluläre Proteasen abgebaut werden (67).

In E. coli-Zellen ist ein Proteasesystem nachgewiesen worden, das zwischen normalem und anormalem Protein unterscheiden

kann (68).

Die Halbwertszeiten von Nonsensproteinen sind unabhängig vom Zellcyclus wesentlich geringer als die von normalem Protein. So werden unvollständige Polypeptide, die sich aus Nonsensmutationen oder der Wirkung von Puromycin ergeben haben, oder Proteine, die Aminosäureanaloge enthalten, sehr schnell abgebaut (69).

Wie PINE 1967 feststellte (70), ist die Proteolysegeschwindigkeit in den Zellen unter UV-Bestrahlung um ein Mehrfaches höher als normal.

c) Bereitstellung von Aminosäuren zur Energieproduktion bei Mangel an Energiesubstraten

Der Abbau von Proteinen bei mangelnder Versorgung mit Energiesubstraten ist für die Zelle lebenswichtig. In diesem Fall stellen die Proteine ein Energiereservoir dar.

d) Maturationsvorgänge

Eine weitere Aufgabe der intrazellulären Proteasen liegt in der sogenannten Maturation, zu der die Deformylierung von neusynthetisiertem Protein gehört, das ja am Aminoende einen N-Formyl-methionylrest trägt. 1969 isolierten LIVINGSTON und LEDER (71) eine intrazelluläre Deformylase, die in der Lage ist, den N-Formylrest von N-Formylpeptiden und auch von N-Formylmethionin zu entfernen.

e) Spezifische Inaktivierung von Enzymen zur Stoffwechselregulation

Von HOLZER und seinen Mitarbeitern (41) sehr gut untersucht ist der Mechanismus der spezifischen Enzymaktivierung- und inaktivierung durch Proteasen der Hefe. So kann die Hefeproteinase A die Endopeptidase B und die C-terminale Exopeptidase C (Carboxypeptidase Y) durch Inaktivierung der spezifischen Inhibitoren der genannten Enzyme aktivieren. Die Proteinase A und B inaktivieren ihrerseits die Tryptophan-Synthase und den Protease C-Inhibitor, die Proteinase B auch die Chitin-Synthase und den Proteinase A-Inhibitor.

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT pH-OPTIMUM	HEMMSUBSTANZEN	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
PEPTIDASE α	SACCHARO - MYCES CARLSB.	20000		Z-AHLREICHE Z-DIPEPTIDE AKTIVITÄTS - OPTIMUM GG. Z-GLY - LEU pH 6,0 - 6,2 CASEIN pH 3,0	EDTA, PHENANTHROLIN (REV. MIT Mg^{2+}) SCHWERMETALLE SH-REAGENTIEN PCMB	Mg^{2+}	ÄHNLICH PROTEINASE C VON S. CEREV.	53-55
PEPTIDASE β	SACCHARO - MYCES CARLSB.	80000		Z-DIPEPTIDE OPTIMUM pH 6,0 - 6,2. CASEIN AUFHEBUNG Z-TRIPEPTIDE DURCH CYS Z-DIPEPTID- AMIDE	D.F.P. PCMB JOD - ACETAT (TEILWEISE AUFHEBUNG DURCH CYS ODER ME)		ÄHNLICH PROTEINASE B VON SACCH. CEREV. SERIN- PROTEINASE	53-55
PROTEINASE A SAURE PROTEINASE	S. CEREV.	60000		CASEIN pH 2,0 DEN. HÄM pH 3,0	SPEZ. INHIBI- TOR VON HEFE	PROTEINASE B VON HEFE AKTIVIERT ZYMOGEN VON A	INAKTIVIERT TRYPTOPHAN - SYNTH. TRYPTOPH- DEF. VOR. PROTEIN- NASE B - UND C - INH VON HEFE	9.11.12, 39-45
PROTEINASE B	S. CEREV.	32000		DEN. HÄM UND CASEIN pH 9,0 ATEE, BAEE pH 8,0	PMSF, D.F.P. SPEZ. INHIBI- TOR VON HEFE	PROTEINASE A VON HEFE AKTIVIERT ZYMOGEN	INAKTIVIERT TRYPTOPHAN - SYNTH. GLUTAMAT- OXAL - ACETAT - TRANSAMINASE, FRUCTOSE OLI- PHOSPHINASE - PROTEINASE - A - INHIB VON HEFE	9.11.12, 24,26-23 39-45
PROTEINASE C CARBOXY - PEPTIDASE Y	S. CEREV.	61000		ATEE, BAEE COOH-TERMAS VON POLY - PEPTIDKETTEN pH 25000	PCMB, D.F.P. SPEZ. INHIB. VON HEFE	PROTEINASE A UND B VON HEFE AKTIV. ZYMOGEN	15% K.H.	29-45

TABELLE I: PROTEOLYTISCHE ENZYME DER HEFE

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTERENKHEITEN	SPEZIFITÄT	HEMISTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
AMINOPEPTIDASE	SACCHAROM. CEREV.			DIPEPTID-AMIDE-ESTER KEINE DIPEPTID-AMIDE-ESTER AKTIV-OPTIM. GG. AGG. PH 6,7-7,0 KEIN PRO. X-Y	HCN, H ₂ S		BEI ZUSATZ VON CHLORIDIEN ODER HEFEKOCHSALT AUCH SPALTUNG VON DIPEPTIDEN	75-36
AMINOPEPTIDASE	SACCHAROM. CEREV.	670000		DIPEPTID-AMIDE-ESTER KEINE DIPEPTID-AMIDE-ESTER ESTER AKTIV OPTIMUM GG. GG. PH 7,9 GG. AGG. PH 7,2		CHLORIDIEN Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺		1-6
AMINOPEPTIDASE	SACCHAROM. CEREV.			GG-NH ₂ AKTIV PH 7,0-7,2 MUM. GG. LGG. PH 7,0 SPAL- TET LGG. 5x SCHNELLER ALS LG KEINE SPALTUNG VON AG. GG. GL.	EDTA, PHENANTHRO- LIN		HOHERES MG ALS HEFEDI-PEPTIDASE	82
AMINOPEPTIDASE III	SACCHAROM. CEREV.			AKTIVITÄT- OPTIMUM GG. L-P-NA PH 7,6			4. AMINOPEPT. IN HEFEN AKT. AP III HEFE. VAKUOLEN MG III AM GROSSTEN WENIG STABIL. VERMEHRTES APPARETIEREN IN STATIONEN UND WENN IN WACHSTUMSSTADIUM MANGEL AN GLU O. CASEINHYDROL.	21, 22

Fortsetzung der TABELLE I: PROTEOLYTISCHE ENZYME DER HEFE

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT pH-OPTIMUM	HEMMSTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
AMINOS - NAPHTYL - AMIDASE	SACCHAROM. CEREV.			A-9-NA L-9- NH ₂ AKTIV - OPTIMUM GG, L-9-NA, pH 8,5	EDTA	Ba ²⁺		52
AMINO - PEPTIDASE I	SACCHAROM CEREV	20000		BEVORZUGT HYDROPHOB N-TERM. AS. AKTIV-OPTIM. MUM GG L-P- NAPHTH76:ILE- PHE-VAL-GLY NIGHT GE - SPALTEN	EDTA, PHENAN- THOLIN, RES. Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , PCMBE, CYS, JOD- ACETAT	Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	METALLENZYM SH-ENZYM	7
AMINO - PEPTIDASE II	SACCHAROM. CEREV	34000		DIPEPT. DI - PEPTIDESTER, TETRAPEPT. NIGHT L-P-NA L-9-NA, LEU - NH ₂				7
DIPEPTI - DASE	SACCHAROM. CEREV.	130000	4 UNTEREINHEITEN MG. 130000 I. MG. 185000 II. MG. 185000 III. MG. 35000 IV. (VERTEILUNG VON INKUBATIONS - DAUER ABHÄNGIG) III. IST HAUPT - PEAK	SPALTIET NUR DIPEPTIDE BEVORZUGT DIPEPTIDE AKTIV. UNTERS. ALKYL SEITEN RESTEN AKTIVITÄTS- OPTIMUM GG ALA - GLY pH 8,0	EDTA, DMP, PHENANTHRO- LIN, TITEL - WEISE REV. MIT Mg ²⁺)	Mg ²⁺	METALLENZYM 79 ATOME ZINK / 130000 NH ₂ - TERM GLY: Co ²⁺ AKTIVIERT. Mn ²⁺ , Zn ²⁺ HEMMEN NH ₂ - TERM. ALA: Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ HEMMEN, NH ₂ TERM. LEU: Co ²⁺ , Zn ²⁺ HEMMEN, Mn ²⁺ AKTIVIERT. ENZ IN ZUF. VON KONFORMATIONEN ABHÄNGIG VON PH. SUBSTRATKONZ. KEINE ÄNDERUNG VON MG.	8-11 56-64

Fortsetzung der TABELLE I: PROTEOLYTISCHE ENZYME DER HEFE

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT pH OPTIMUM	HEMSTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
LEUCIN - AMINO - PEPTIDASE (LAP)	SCHWEINE - NIEREN	300000	4 UNTEREINHEITEN (IDENTISCH) IN 8M GU ⁺ ·HCl MG 84000	L-AS-DERIV. BEVORZUGUNG VON HYDRO- PHOBEN AS IN N-TERM STELLUNG L- LEUCPEPTIDE L-LEU·AMINO L-LEU-ESTER AUCH L-PRO- DERIV. NICHT AS-PRO-·x·pH- OPTIMUM 9,5	SCHWERMETALLE PHENANTHROLIN EDTA (IRREV.) ABERTERE AKTIVIERUNG Mg ⁺⁺ AKT. LAP MIT EDTA REV INAKTIVIERBAR	Mn ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , JMIT Mg ⁺⁺ AKTIVIERT + Mn ⁺⁺ → WEI- TERE AKTIVIERUNG	ZINK-ENZYM 4-6 g ATOME ZINK PRO 300000 ZINK AUSTAUSCHBAR GG CADMIUM → INAKTIV. REAKTIVIERUNG MIT ZINK	6, 73-75
LEUCIN - AMINO - PEPTIDASE (LAP)	RINDER - AUGENLINSEN	327000	6 UNTEREINHEITEN (IDENTISCH) MG 54000 IN GU ⁺ ·HCl HARNSTOFF XSDS (AUCH STANDE BEI MG 15000) (IN SDS, MCA 54000±2) FÜR LEUCIN 54000±4 } BANDEN 54000±6 }	WIE LAP AUS SCHWEINE - NIEREN, pH - ABHÄNGIG - KEIT MIT UND VORNE-Mg VERSCHIEDEN EDTA (REV.) HYDROPHOBE FÜR LEUCIN AMID AUCH TRANSAML- DASE AKTIV	Co ⁺⁺ , Hg ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Pb ⁺⁺ , Cys GU ⁺ ·HCl HARNSTOFF JODACETAMID (REV.) VERSCHIEDEN EDTA (REV.) HYDROPHOBE CARBONS UND AMINE	Zn ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	ZINK-ENZYM 2g ATOME ZINK/ 54000 ZBINUNGS STELLEN FÜR ZINK, ESSEN - TIELL FÜR AKTIV- VITAT, 1 FÜR AKTIV- VIERUNG LETZTE- RE DURCH ZINK, Mn ODER Mg BE- SETZBAR-SPEZ AKTIVITÄT Zn/Zn- ENZYM Zn/Mg - ENZYM Zn/Mn - ENZYM VER - SCHIEDEN, MAX 9 ATOM Mn ⁺⁺ ODER Mg ⁺⁺ /54000 ZINK-GOLD- MUM AUSTAUSCH- BAR → INAKTIV LAP → ZINK RE- AKTIV AKTIVIER- BARKEIT Zn/Zn - ENZYM MIT Mg ⁺⁺ UND Mn ⁺⁺	76-87

TABELLE II: EIGENSCHAFTEN EINIGER AUSGEWÄHLTER AMINOPEPTIDASEN

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT PH OPTIMUM	HEIMSTOFFE/ AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
LEUCIN - AMINO - PEPTIDASE (LAP)	E. COLI	323000	6 UNTEREINHEITEN IN MG 52000 IN SDS + MCA	WIE LAP AUS SCHWEINE - NIEREN PH - OPTIMUM GG. MET-ALA-SER PH 8,5	EDTA (REV. MIT Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++})		88
LEUCIN - AMINO - PEPTIDASE (LAP)	MAMMALIAN CONNECTIVE TISSUE	400000	5 ELEKTROPHORET. VERSCHIEDENE ISO-ENZYMEN (4 AKTIV.) KLEINSTE UNTEREINHEIT MG 25000 IN AGAROSE GELEL. MAGGORE- GAT MG 150000 KLEINSTE AKTIVE UNTEREINHEIT MG 100000	ÄHNLICH WIE LAP AUS SCHWEINE - NIEREN	Mn^{++} (NICHT Mg^{++}) EDTA, Zn^{++} PCMB, NEM	2 VERSCHIEDENE UNTEREINHEITEN, SPEZ. AKTIVITÄT ISOENZYMEN VER- SCHIEDEN ISO - ENZYMEN IM GLEICHGEWICHT BEI CHROM AN- DEAE-CELL VIELE SCHULTERN → HINWEIS AUF ISOENZYMEN	74, 89, 90
AMINO - PEPTIDASE	E. COLI B	350000 400000	6 UNTEREINHEITEN IN MG 60000 IN SDS + MCA A. OHNE MCA. MEHRERE BANDEN	BEVORZUGT LEU UND MET IN N-TERM. PEPTIDEN PFEILDE BESSERE DIPEPTIDE AKTIVITÄTS - OPTIMUM PH 7,5-9,5 MIT MPT	PCMB (REV. MIT MCA UND DTT) EDTA REV. IN GD. LI $\oplus$	SH-ENZYM METALL-ENZYM	91-93
AMINO - PEPTIDASE M ALANIN - AMINO - PEPTIDASE	SCHWEINE - NIEREN (PARTIKEL GEBUNDEN)	2800000	10 UNTEREINHEITEN (2 VERSCHIEDENE) MG 300000 ± 5000 IN GUAAHCL AUCH UNTEREINHEIT MIT MG 60000 BEI PH 2,0 IN GUAAHCL 2/3 280000 1/3 60000	BEVORZUGT ALANIN IN N-TERM. STEL- LUNG PH OPTI- MUM Vmax. PH 8,8 - 9,0 Km. PH 7,0-7,3 GG ALA-p-NA	EDTA, PHE - NANTHROLIN GUA-HCL, AMI- NOSAUAREN ALANIN, KOL- HOL $\oplus$ TALLOL- KOLS. 1-H- DIAZO TETRA - ZOL, TETRA - NITROMETHAN	ZINK-ENZYM 2,0 ATOME ZINK/280000 20 % K H 2 UNTER - EINHEITEN DURCH DISULFIDBRÜCKE ZUSAMMEN GE - HALTEN 3 BINDUNG STELLEN FÜR SUBSTRAT FÜR N-TERM. ALA/SER VORLETZTE	94-101

Fortsetzung der TABELLE II

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT	HEMMSTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
AMINO - PEPTIDASE	CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM	34.0000	MG 63000 IN SDS UND MCA 6 UNTEREINHEITEN	BREITE SPE- ZIFITÄT, AS- P-NA SCHLE- CHTE SUBS- TRATE, AS-P- NA KEINE SUBSTRATE AKTIVITÄTS- OPTIMUM PH 8,6 (AGG.)	PCMB EDTA (REV.)	Co ⁺⁺ , Mn ⁺⁺	METALL-ENZYM, SH-ENZYM	102
AMINO - PEPTIDASE I	PEA	58000		L-AS-DERI- VATE MIT HY- DROPHOBEN AS IN N-TERM. STELLUNG AKTIVITÄTS- OPTIMUM GG L- P-NA, PH 7,0 SPALZT KEIN PRO-ARG, GLU	PCMB (REV. MIT CYS)		AUSGEPRÄGTE SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSPEZIFI- TÄT IN X-Y-Z HÖHERES V MIT LEU, PHE ALS X, PHE ALS Z, FREIE COOH-GRUPPE ERNIEDRIGT V	103
AMINO - PEPTIDASE	ASPERGILLUS ORYZEA	60000		L-LEU-DER PH 8,0	EDTA (REV MIT Co ⁺⁺)	Co ⁺⁺		104
AMINO - PEPTIDASE K	TRITIRACHIDIUM ALBUM LIMBER	19000		AS-DERIVATE MIT HYDRO- PHOBEN AS IN N-TERM. STELLUNG, AKTIVITÄTS- OPTIMUM PH 8,0 GG L-AS- P-NA	EDTA (REV MIT Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺) ALIPHATISCHE N-AMINE UND ALKOHOLE, PUROMYCIN	Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺	METALL-ENZYM STOCHOM. MEN- GEN Zn ⁺⁺	105, 106

Fortsetzung der TABELLE II

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT pH OPTIMUM	HEMISTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN LITERATUR	
AMINO - PEPTIDASE	GERSTE	85000		BEVORZUGT HYDROPHOB AS IN N-TERM STELLUNG, SPALTET AUCH PRO-PEPTIDE AKTIVITÄT'S OPTIM. GG. AS- II-NA, pH 7,2	PCMB	SH-KOMPO - NENTEN	SH-ENZYM 107	
AMINOPEP- TIDASE M ALANIN - AMINO - PEPTIDASE	MENSCHLICHE LEBER	223000	2 UNTEREINHEITEN MG 120000 IN SDS, UND IN VERDÜNN- TEN ENZYMLÖSUN - GEN	BREITE SPEZI- FITÄT L-ALA- NIN IN N-TERM STELLUNG IN AS-DER BE- VORZUGT	EDTA, I.BET 60°C (IRREV) PHE - NATHROLIN (REV MIT Co ⁺⁺) Zn ⁺⁺ , KCN Na ₂ S ₂ NaH ₂ PO ₄ SUBS - TRAT ANALOGE PCMB, Hg ⁺⁺	Co ⁺⁺ , Zn ⁺⁺	ZINK-ENZYM 1g ATOM/120000, 2BIN- DUNGSSTELLEN, 1 FÜR ZINK IST ESSENTIELLZWEITE FÜR ZINK ODER COBALT (NUR LOSE BINDUNG), 3 SUBS - TRATBINDUNGS - STELLEN IM EN - ZYM, 2 IONISIER - BARE GRUPPEN IM AKTIVEN ZENTRUM 118000 UNTEREIN- HEIT IN VERDÜNN- TEN ENZYMLÖS.	108-116
AMINOPEP- TIDASE M ALANIN - AMINO - PEPTIDASE	DARMSCHLEIM HAUT VOM SCHWEIN	240000- 280000	6 UNTEREINHEITEN MG 49000 IN SDS AUCH 2 BANDEN MIT MG 113000 UND 97000	ÄHNLICH WIE ALANIN -AP AUS MENSCHL LEBER, AGG BESSER ALS A-ß-NA		Zn ⁺⁺	ZINK-ENZYM 2 g ATOME ZINK PRO 280000 23% K.M.	117

Fortsetzung der TABELLE II

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	pH OPTIMUM	SPEZIFITÄT	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN LITERATUR	
AMINOPEPTIDASE I	BACILLUS STEARO - THERMO - PHILUS	400000	12 UNTEREINHEITEN MG 36000 (2 VERSCHIEDENE) 1 REAKTIVIERBAR, 1 NICHT, $\alpha + \beta$ IN 8M HARNSTOFF EDTA, MCA	HYDROPHOB AS IN N-TERM STELLUNG BEI VORZUGT AUCH PRO-PEPTIDE GESPALTEN, NICHT ABER X-PRO-Y	HARNSTOFF	REAKTIVIERUNG 15 ^h BEI 80 C u. 10 ⁻³ M Co ⁺⁺ Co ⁺⁺ BEI pH 8,1	α/β - VERHALT - IA = $\frac{1}{2}$, IB = $2\frac{1}{2}$, IC = $\frac{1}{2}$ KUNSTLICH α -12 (AKTIV) IB = α/β -2/1 MIT 70% ÜBER - WIEGEND α/β GLEICH GROSS, UNTERSCHIEDL. LADUNGEN DIPEP- TIDE MIT N-TERM, ASPGLY NUR VON ISOENZYM MIT β , (IC AM BESTEN) GESPALTEN $\alpha + \beta$ AKTIV, ABER UN - TERSCHIEDLICHE AKTIVITÄTEN	118-122
AMINO - PEPTIDASE B EC 3.4.11.6.	RATTENLEBER	95000		LYS-PEPTIDOE LYS-D-NÄ, ARG-PEPTIDOE ARG-D-NÄ AKTIVITÄTS - OPTIMUM pH 7,0 NANTHROLIN NICHT GESPAL - TEN HIS-D-NÄ ORNIT-D - NÄ PMSF	Hg, PCMB JODBENZOAT MERCAPTO - ATHANOL EDTA, o - PHE - NANTHROLIN (IRREVER - SIBEL) PMSF	CHLORIDIONEN	KEINE VERSCHIE - BUNG DES pH-OP - TINUMS BEI Cl ⁻ - AKTIVIERUNG BEI OPTIMALER Cl ⁻ - KONZ., SPALTET LYS VON KALLIDIN - 10 ↓ BRADYKININ NICHT STEREO - SPEZIFISCH	123,124

Fortsetzung der TABELLE II

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT pH-OPTIMUM	HEMMSOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
AMINO - PEPTIDASE B E.C. 3.4.11.	NEUROSPORA CRASSA	96000		ÄHNLICH APB AUS RATTEN - LEBER, AKTIV - OPTIMUM GG LYS-0-NA pH 7,5	EDTA (IRREV.) PCMB		METALL-ENZYM	125
PROLIN - AMINO - PEPTIDASE E.C. 3.4.14.	E COLI			SPEZIFISCH FÜR N-TERM FÜR N-TERM KANN IN UNAB- HÄNGIGKEIT PEPTIDGRÖSSE SPALTET KEIN N-TERM HYD- ROXYPROLIN	PCMB, JODACEAMID	Mn ⁺⁺ , Mg ⁺⁺		126, 127
AMINO - PEPTIDASE P IMIDO - PEPTIDASE E.C. 3.4.11.9	E.COLI B	230000 (200000)	2 UNTEREINHEITEN MG 20000 BEI 25 mg/ml MG 100000 BEI 1,5 mg/ml	L-AS-PRC X-PRO-Y AKTIVITÄT - OPTIMUM 68 FREIE N-TERM AMINGRUPPE NOTWENDIG	EDTA (REV) MIT Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Ni ⁺⁺	Mn ⁺⁺	KEINE LINEARE ABHÄNGIGKEIT VON Y VON ENZYM KONZ. ANNAHME. DASS NUR SPE - ZIES MIT MG 100000 AKTIV	128, 129
PYRROLI - DONYL PEPTIDASE 3.4.11.8	PSEUDOMONAS FLUORESCENS BACILLUS SUBTILIS			SPALTET NUR L-PYROGLU - TAMYLPEP - TIDE	PCMB, Hg ⁺⁺ Cu ⁺⁺ , JOD - ACETAT	EDTA, SH-KOMPO - NENTEN	SH-ENZYM	130-132

Fortsetzung der TABELLE II

ENZYM	ORGANISMUS	MG	UNTEREINHEITEN	SPEZIFITÄT	HEMMSTOFFE	AKTIVATOREN	ERLÄUTERUNGEN	LITERATUR
DIPEPTIDYL-AMINO-PEPTIDASE	RINDERMILCH RATTENLEBER	210000 200000	8 UNTEREINHEITEN 2 TYPEN 2 TETRAMERE 2 TYPEN VON UNTEREINHEITEN 1 TYP 3x GROSSER ALS DER ZWEITE	PH OPTIMUM ABSPALTUNG VON DIPEPTI- DEN VOM N- TERM ENDE VON X-Y-NH-R X-Y-OR BESTE SUBSTRATE MIT X+GLY UND Y+ARG. LYS ODER Y+AROM AS WENN X=ARG. LYS → KEINE SPALTUNG ENTWEDER HYDROLYSE PH 5.01 ODER TRANSFERRASE AKT (pH 7.5) AUF AMINE. AS NH ₂ OH, DI- PEPTIDE HO- HERE PEPTIDE (POLYMERISA- TION) SPAL- TUNG WENN X=PRO, KEINE WENN Y=PRO	10 ⁻⁴ M JOD - ACETAT	HALOGENID - IONEN NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ THIOLE Cl ⁻ , Br ⁻ , J ⁻ , I ⁻	SH-ENZYM 8 SH-GRUPPEN/ 230000, UNTEREINHEITEN MIT PCMB (REV MIT THIOLE) UND 1% SDS (IRREV)	133-139

Fortsetzung der TABELLE II

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Spektralphotometer

ZEISS PMQ II mit T/E-Wandler und Potentiometerschreiber
METRAWATT RE 511,
BECKMANN, Modell ACTA III und
HITACHI 101, und SERVOGOR - Schreiber S oder S b (ausge-
rüstet mit logarithmischem Verstärker)

Chromatographie-Ausrüstung

Glassäulen verschiedener Größe von LKB, Bromma, Schweden
Durchflußphotometer LKB Uvicord und Laboratory Data Control
Mod. No. 1522

Fraktionssammler LKB Ultrorac mit LKB 11 300 Ultrograd
Gradient Mixer

Peristaltische Pumpen: LKB Peristaltic Pump Type 4912 A
LKB Perpex Peristaltic Pump 10 200
SERVA E 25, Serva, Heidelberg

Zentrifugen

STOCK-Zentrifuge, W. Stock Maschinenbau KG, Marburg
SORVALL RC-2B, Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Connecticut
BECKMANN L2 - 65, Beckmann Instruments, München

pH-Meter

Radiometer PHM 26 mit Einstabmeßkette INGOLD G 05438 oder
METROHM EA 147 U

Thermostate

MWG LAUDA K 2 RD (Thermostat/Kyrostat) und
MWG LAUDA WB 20 S 8

Leitfähigkeitsmessungen

Digitalmeter DIGI 610, WTW, Weilheim

Gefriertrocknung

ULTRA KYROMAT K 60 SDW, Meßgeräte-Werk LAUDA

Disc-Elektrophoresen

Analytische Disc-Elektrophoresen wurden entweder mit einer von BLOEMENDAHL (140) beschriebenen oder mit einer von NEES und SCHMIDT entwickelten Flachgel-Apparatur durchgeführt. Das Stromversorgungsgerät (maximal 150 mA bei 1000 V, Strom und Spannung getrennt regelbar) wurde von J. BALDUF, Marburg, gebaut.

Densitogramme der angefärbten Gele wurden mit dem "Discolu-meter" - Zusatz zum ZEISS PMQ II und mit einem JOYCE-LOEBL Chromoscan aufgenommen.

Aminosäure - Analysen

wurden mit einem BECKMANN B Flüssigkeits-Säulen-Chromatographen durchgeführt.

Zink - Bestimmungen

erfolgten mit dem Atomabsorptionsspektrophotometer PERKIN - ELMER 300 SG, das mit einer Graphitzelle HGA 70 ausgestattet war.

Isoelektrische Fokkussierung

Elektrofokkussiersäule LKB 8101 (110 ml) mit Netzanschlußgerät LKB 3371.

2.2. Chemikalien

2.2.1. Substrate

L-Leu-Gly-L-Leu, reinst	Serva, Heidelberg
L-Phe-Gly-Gly, reinst	" "
L-Val-Gly-Gly, reinst	" "
L-Pro-Gly-Gly, puriss.	" "
Gly-Gly-Gly, p.A.	" "
D-Leu-Gly-Gly, reinst	" "
L-Leu-Gly-Gly, puriss.	Fluka AG, Buchs SG
L-Ala-Gly-Gly, p.A.	Ferrak, Berlin
L-Leu-Gly, puriss.	Serva, Heidelberg
L-Phe-Gly, reinst	" "
L-Leu-L-Ala, puriss.	" "
L-Leu-L-Leu, puriss.	" "
Gly-Gly, p.A.	" "
Gly-L-Ala, puriss.	" "
Gly-L-Leu, puriss.	" "
L-Pro-Gly, puriss.	" "
L-Ala-L-Thr, puriss.	" "
L-Leu-NH ₂ x HCl, p.A.	" "
L-Leu-OMe x HCl, p.A.	" "
L-Leu-β-Ala, puriss	" "
L-Ala-Gly, puriss.	Fluka AG, Buchs SG
L-Ala-L-Ala, puriss.	" "
L-Ala-L-Leu, puriss.	" "
L-Phe-OMe x HCl, f.biochem.Zw., Merck, Darmstadt	
L-Ala-p-Nitroanilid, f.biochem.Zw., Merck, Darmstadt	
L-Lys-p-Nitroanilid,	" "
L-Pro-p-Nitroanilid,	" "
Gly-p- Nitroanilid,	" "
L-Leu-p-Nitroanilid, f.biochem. Zw., Serva, Heidelberg	
L-Leu-β-Naphtylamid, puriss., Fluka AG, Buchs SG	

Die folgenden Substrate wurden im Peptidlabor des physiologisch-chemischen Institutes II, Marburg, von Herrn

Dr. E. Schaich und Herrn Dr. A. Raschig synthetisiert:

L-Val-Gly, L-Thr-L-Ala, cyclo-L-Thr-L-Ala, N-Formyl-Gly, L-Ala-L-Thr-L-Ala, L-Ala-L-Thr-L-Ala-OMe, L-Ala-L-Thr-L-Gly-OMe, L-Ala-L-Asp-L-Phe-OMe, L-Val-L-Ala-L-Thr-L-Ala, Boc-L-Ala-L-Thr-L-Ala und L-Ala-Gly-Gly-OEt.

2.2.2. Lösungsmittel zur Dünnschichtchromatographie

Butanol-(1) z. Anal.	Merck, Darmstadt
Benzol z. Anal.	" "
Salzsäure, rauchend , z.Anal.	" "
Eisessig z. Anal.	" "
Ammoniak z. Anal.	" "
Propanol-(1), dest.	" "
Äthanol z. Anal.	" "
Pyridin z. Anal.	" "
Ninhydrin z. Anal.	" "
Dinatriumtetraborat z. Anal.	" "
o-Tolidin p.A.	" "

2.2.3. Puffersubstanzen

Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan p.A.	Merck, Darmstadt
Bernsteinsäure p.A.	" "
Ammoniumacetat p.A.	" "
Kaliumdihydrogenphosphat z. Anal.	" "
Dinatriumhydrogenphosphat z.Anal.	" "
Natriumhydrogencarbonat z.Anal.	" "

2.2.4. Neutrale, anionische und kationische Effektoren

Natriumchlorid z.Anal.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid z.Anal.	" "
Natriumbromid, suprapur	" "
(5 x 10 ⁻⁶ % Zn ²⁺)	" "
Natriumfluorid z.Anal.	" "
Natriumsulfat p.A.	" "

Zinkacetat z. Anal.	Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover
Kobalt-(II)-acetat z. Anal.	Merck, Darmstadt
Nickelsulfat z. Anal.	" "
Magnesiumsulfat z. Anal.	" "
Mangan-(II)-sulfat z. Anal.	" "
Eisen-(II)-sulfat z. Anal.	" "
Quecksilber-(II)-acetat z. Anal.	" "
Kupfer-(II)-sulfat z. Anal.	" "
Äthylendiamintetraessigsäure p.A.	" "
1,10-Phenanthroliniumchlorid p.A.	" "
L-Cystein f.biochem. Zw.	" "
2,3-Dimercaptopropanol f.Komplex.	" "
1,4-Dithioerythrit f.biochem.Zw.	" "
Harnstoff z. Anal.	" "
Guanidinhydrochlorid puriss.	Fluka AG, Buchs SG

2.2.5. Materialien für die Enzymisolierung

Sephadex G-25, G-100, G-150, G-200	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Servacel DEAE-Cellulose 23 SH, p.A.	Serva, Heidelberg
Servacel DEAE-Cellulose GS p.A.	Serva, Heidelberg
Sepharose 6 B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dextranblau 2 000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ammoniumsulfat f.biochem. Zw.	Merck, Darmstadt
Essigsäure p.A. (min.99%)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat p.A.	Merck, Darmstadt
L-Tyrosinmethylester x HCl p.A.	Serva, Heidelberg
Papain, 1-Anson-E/g	Merck, Darmstadt

2.2.6. Reagentien für die Elektrophoresen und die Dichte- gradientenzentrifugationen

Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylen-bis-acrylamid p.A.	Merck-Schuchardt, München
N,N',N'',N'''-Tetramethyl- äthylendiamin p.A.	Merck-Schuchardt, München
Natrium-Dodecylsulfat p.A.	Merck-Schuchardt, München
Trichloressigsäure p.A.	Merck, Darmstadt

Lysozym, 3x krist, reinst (E.C.3.2.1.17)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin, reinst	" "
Hämoglobin v.Rind, reinst	" "
Katalase f.anal.Zw. (E.C.1.11.1.6)	" "
ß-Galaktosidase(E.coli),Lyophylisat,	Boehringer, Mannheim
L-Asparaginase (E.coli) (E.C.3.5.1.1)	Bayer, Wuppertal
Phosphorylase A (Kaninchenmuskel) (E.C.2.4.1.1)	Boehringer, Mannheim
Alk.Phosphatase (Kälberdarm),Susp., (E.C.3.1.3.1)	Boehringer, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase (Schweinemuskel) Suspension, (E.C.1.1.2.3)	Boehringer, Mannheim
Chymotrysinogen	Boehringer, Mannheim
Fluoresceinisothiocyanat, rein	Serva, Heidelberg
2-Mercapto-äthanol,puriss.	Fluka AG, Buchs SG

2.2.7. Reagentien für die Isoelektrische Fokkussierung

Ampholine, pH 3-10, LKB,Bromma, Schweden
Saccharose f.d. Dichtegradientenzentrifugation,
Merck, Darmstadt

2.2.8. Reagentien für die Zuckerbestimmungen

Dowex 50 W X 8	Roth, Karlsruhe
Dowex 1 X 4	Serva, Heidelberg
D-Glucose,	
D-Mannose,	
D-Galaktose,	
D-Glucosaminhydrochlorid,	
N-Acetylneuraminsäure f.biochem.Zw.	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure,95-97%(d=1,84) z.Anal.	Merck, Darmstadt
Anthron, z.Anal.	Merck, Darmstadt
Resorcin z. Synth.	Merck-Schuchardt, München

Acetylaceton z.Synth.	Merck-Schuchardt, München
Thioharnstoff p.A.	Merck-Schuchardt, München
Isoamylalkohol, rein	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat z.Anal.	Merck, Darmstadt
p-Dimethylaminobenzaldehyd p.A.	Merck, Darmstadt
O-Dianisidin z.Anal	Merck, Darmstadt
Perjodsäure, krist.,p.A.	Merck, Darmstadt
Schiffs Reagenz f.Aldehyde	Merck, Darmstadt
Diazo-Echtblau B	Serva, Heidelberg
Biochemica-Testkombination	
"Blutzucker GOD-Peeid"	Boehringer, Mannheim

2.2.9. Reagentien für die Zink-Bestimmung

Dithizon, z.Anal.	Merck, Darmstadt
Tetrachlorkohlenstoff, reinst	Merck, Darmstadt

2.2.10. Reagentien für die Aminosäureanalyse

Ninhydrin, p. A.	Merck, Darmstadt
Thioglykolsäure, z.Anal.	
Ameisensäure (98-100%), p.A.	" "
Perhydrol (30% H_2O_2), z. Anal.	" "
L-Glutaminsäure f.biochem.Zw.	" "
Aminosäuretestgemisch (2,5 μ M/AS)	Beckmann Instruments, München
Methylcellulose z.Synth.	Merck-Schuchardt, München
Salzsäure (37%) suprapur	Merck, Darmstadt
Zinn-(II)-chlorid z.Anal.	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat z. Anal.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid p.A.	Merck, Darmstadt
N-Caprylsäure f.biochem.Zw.	Merck, Darmstadt
Brij 35	Riedel de Haen, Seelze-Hann.

2.2.11. Modifizierungsreagentien

Essigsäureanhydrid p.A.	Merck, Darmstadt
Bernsteinsäureanhydrid, purum	Fluka AG, Buchs SG
Tetranitromethan p.A.	Fluka AG, Buchs SG
5-Aminotetrazol, purum	Fluka AG, Buchs SG

Natriumnitrit p.A.	Merck, Darmstadt
Jodacetamid, puriss.	Fluka AG, Buchs SG
N-Äthylmaleinimid f.biochem.Zw.	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid, reinst	Serva, Heidelberg
Diäthylpyrocarbonat ("BAYCOVIN")	Bayer, Leverkusen

2.3. Methoden

2.3.1. Dünnschichtchromatographie

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel SIF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, verwendet.

Als Laufmittel dienten:

- I n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
- II n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)
- III n-Propanol/Ammöniak/Wasser (6:3:1)
- IV n-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/
: Wasser (4:1:1:1:2:1)

Verbindungen mit freier oder geschützter Aminogruppe wurden durch Besprühen der Chromatogramme mit einer 5%-igen Lösung von Ninhydrin in Butanol/2N Essigsäure (95:5 v/v) und anschließendem kurzen Erhitzen im Trockenschrank auf 110°C sichtbar gemacht (141).

Nach solcher Behandlung der Chromatogramme wurden diese mit 50 mM Boraxlösung besprüht, kurz mit Chlor behandelt, ca. 5 Minuten im Trockenschrank auf 110°C erwärmt und zum Schluß mit einer essigsäuren Lösung von o-Tolidin und Kaliumjodid besprüht (142,143).

Die Chlor-Tolidin-Reaktion wird durch die vorangegangene Behandlung der Chromatogramme mit Ninhydrin nicht gestört.

2.3.2. Qualitative und quantitative Aktivitätsbestimmungen

2.3.2.1. Qualitative Aktivitätsbestimmungen

5 mM Lösungen verschiedener Peptide und Peptidderivate in 0,1 M Phosphat/Boratpuffer, pH 7,8 (0,1 M NaCl; 0,1 mM Zn^{2+}) wurden bei 40°C mit Aminopeptidaselösung versetzt (500 µl Substratlösung + 50 µl Enzymlösung).

Nach 30 Minuten, 1 h, 2 h, 4 h und 12 h wurden Proben gezogen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Die Spaltprodukte galten als identifiziert, wenn ihr R_f -Wert in mindestens vier Laufmitteln mit denen der zum Vergleich mitlaufenden Aminosäuren und Peptiden übereinstimmte.

2.3.2.2. Quantitative Aktivitätsbestimmungen

a) Die Aminopeptidaseaktivität kann quantitativ durch die UV-Methode von SCHMITT und SIEBERT (144) bestimmt werden. Dabei verfolgt man die Abnahme der Extinktion bei 230-240 nm, die auf die Spaltung von Peptidbindungen durch die Amino-peptidase zurückgeht. Diese Methode ist anwendbar bei der Spaltung von Aminosäureamiden, Dipeptiden und Tripeptiden, bei den letzteren allerdings nur beschränkt, und zwar nur dann, wenn das Reaktionsprodukt der enzymatischen Spaltung ein Dipeptid ist, das von der Aminopeptidase nicht oder nur sehr langsam angegriffen wird, zum Beispiel bei der Spaltung von Tripeptiden des Typs Y-Gly-Gly.

Im Standardtest wurden 20 µl Enzymlösung 10 Minuten in Halbmikroküvetten bei 40°C mit 500 µl Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer (145) vom pH 7,8 (0,1 M NaCl, 0,1 mM Zn^{2+}) vorgewärmt (Chlorid- und Zink-Ionen sind zur Entfaltung der vollen Aktivität der Aminopeptidase I notwendig).

Die Reaktion wird dann durch die Zugabe von 100 µl bei 40°C vorgewärmter Substratlösung gestartet.

Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden graphisch aus der Extinktionsänderung bei 235 nm erhalten, die mit Hilfe eines ZEISS PMQ II Spektrophotometers gemessen wurde.

Bei jeder Messung wurde auch die Gesamttextinktionsänderung

gemessen.

b) Die Spaltung von Aminosäure-p-Nitroaniliden wurde spektrophotometrisch bei 405 nm wie von TUPPY et al. (146) beschrieben gemessen.

c) Andere Substrate wurden mit Aminopeptidase I in dem eben erwähnten Puffer inkubiert.

Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, mit einem Überschuß eiskaltem Citrat/HCl-Puffer, pH 2,2 (147), gemischt und der Aminosäureanalyse unterworfen.

Eine Einheit der Aminopeptidasaktivität ist definiert als die Enzymmenge, die unter den beschriebenen Bedingungen 1 μ M Substrat pro Minute spaltet.

2.3.3. _ _ Metallfreie Aminopeptidase_I

Experimente zur Aktivierung durch Metall- und Halogenid-ionen wurden mit EDTA-behandeltem, weitgehend zinkfreiem Enzym durchgeführt, das wie folgt hergestellt wurde:

Konzentrierte Aminopeptidaselösungen, die man durch Einengen des Enzyms mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle erhielt, wurden bei 4°C gegen 10^{-3} M EDTA-Lösungen in 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,0) dialysiert bis keine Aktivität gegenüber Leu-Gly-Gly (Aktivitätsbestimmung wie in 2.3.2.2. a, Substratkonzentration 10 mM, Testpuffer ohne Zn^{2+}) mehr festzustellen war. Anschließend wurde 12 h gegen 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,0, dialysiert.

Die so erhaltene Enzymlösung wurde von überschüssigem EDTA durch Chromatographie an einer Sephadex G 25-Säule befreit (2 x 20 cm), die mit 10^{-3} M EDTA im obigen Puffer gewaschen und mit 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,0, (zur Befreiung von Zink vorher mit Dithizon in Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt, ebenso wie der Dialysepuffer) äquilibriert worden war.

Die zinkfreien Aminopeptidaselösungen konnten über längere

Zeiträume ohne Aktivitätsverlust bei -20°C aufbewahrt werden.

2.3.4. Aktivierung durch Metall- und Halogenidionen

a) 100 μl des wie in 2.3.3. erhaltenen zinkfreien Enzyms (Enzymkonzentration 0,1 mg/ml) wurden bei 40°C in 700 μl Kolthoff-Puffer (145), pH 7,8, vorinkubiert, der die gewünschte Konzentration an Effektoren aufwies. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μl 100 mM Leu-Gly-Gly im gleichen Puffer gestartet.

Bei der Aktivierung durch Zn^{2+} wurden sehr niedrige Zinkkonzentrationen ($< 10^{-7}\text{M}$) durch einen Zn^{2+} /Nitrilotriessigsäure Metallpuffer nach COHEN und WILSON (148) eingestellt (10 mM NTA und die nötige Menge Zn^{2+} in Phosphat/Borat-Puffer, pH 7,8; 0,1 M KBr).

Man inkubierte über Nacht bei 25°C . Die Aktivitäten wurden mit Leu-p-NA bestimmt und auf die Werte der Leu-p-NA-Hydrolyse in Gegenwart von 100 mM Br^{-} und 100 μM Zn^{2+} (Aktivität = 100%) bezogen.

b) Aminopeptidase I (0,2 mg/ml) wurde 48 h gegen 10 l 10^{-3}M EDTA in 0,2 M Ammoniumacetatpuffer, pH 6,0, dialysiert. Anschließend wurde 2 x 24 h gegen je 5 l 10^{-3}M Metallionenlösung im gleichen Puffer dialysiert und danach die Aktivitäten bestimmt (nach 2.3.2.2.a).

Die erhaltenen Werte wurden auf die Aktivität der gegen reinen Puffer dialysierten Enzymlösung bezogen (= 100%). Die Messungen erfolgten mit Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer (pH 7,8) in Gegenwart von

- α) 0 M KBr, 0 M Zn^{2+} ,
- β) 0 M KBr, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ Zn^{2+} und
-) 0,1 M KBr, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ Zn^{2+} .

Die angegebenen Bromid- und Zinkkonzentrationen sind Endkonzentrationen in der Küvette.

2.3.5. pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität und seiner Hitzebeständigkeit, Einfluß von Aktivatoren

250 µl des nach 2.3.3. EDTA-behandelten Enzyms (0,1 mg/ml) wurden in Kunststoffreagenzgläsern (mit EDTA-Lösung und dann mit bidestilliertem Wasser gespült) mit 1750 µl Kolthoff-Puffer des jeweiligen pH-Wertes verdünnt.

Es wurde hinzugefügt:

- a) 500 µl bidest. Wasser, oder
- b) 250 µl bidest. Wasser + 250 µl 10^{-3} M Zn^{2+} , oder
- c) 250 µl bidest. Wasser + 250 µl 0,6 M KBr und
- d) 250 µl 10^{-3} M Zn^{2+} + 250 µl 0,6 M KBr.

Kaliumbromid und Zinkacetat waren in bidestilliertem Wasser gelöst.

Die so erhaltenen Enzymlösungen wurden über Nacht bei 4°C stehengelassen und dann halbiert.

Eine Hälfte wurde in Eiswasser gestellt, die zweite Hälfte (alle Proben gleichzeitig) 5 Minuten bei 60°C im Wasserbad erhitzt und danach sofort wieder in Eiswasser gestellt.

Die Aktivitätsbestimmungen wurden wie folgt durchgeführt:

- a) 1 ml Enzymlösung + 200 µl bidest. Wasser,
- b) 1 ml Enzymlösung + 100 µl bidest. Wasser
+ 100 µl $1,5 \times 10^{-3}$ M Zn^{2+} ,
- c) 1 ml Enzymlösung + 100 µl bidest. Wasser
+ 100 µl 0,9 m KBr und
- d) 1 ml Enzymlösung + 100 µl 0,9 M KBr
+ 100 µl $1,5 \times 10^{-3}$ M Zn^{2+} .

Die obigen Lösungen wurden in der Küvette bei 40°C mit 800 µl Kolthoff-Puffer vom jeweiligen pH versetzt und 15 Minuten bei dieser Temperatur gehalten, bevor die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl 100 mM Leu-gly-Gly in bidest. Wasser gestartet wurde.

Die Endkonzentration aller Zink enthaltenden Lösungen war 10^{-4} M Zn^{2+} , die Endkonzentration aller Bromid enthaltenden Lösungen war 60 mM Br^- , [S] war jeweils 20 mM.

2.3.6. Stabilität des Enzyms in Abhängigkeit vom pH, Einfluß von Aktivatoren

Zinkfreies Enzym wurde wie unter 2.3.3. dargestellt. Die Konzentration des verwendeten Ammoniumacetatpuffers war hier allerdings nur 10 mM (pH 6,0).

250 µl des jeweiligen Puffers (pH 4-11) wurden mit Eiswasser gekühlt und mit 50 µl Enzymlösung (1,8 mg/ml) versetzt.

Nun fügte man noch zu den Serien

- a) 100 µl bidest. Wasser,
- b) 50 µl bidest. Wasser + 50 µl 0,6 M KBr und
- c) 50 µl 0,6 M KBr + 50 µl 10^{-4} M Zn^{2+} hinzu.

Die Aktivitäten wurden zunächst sofort und danach in verschiedenen Zeitabständen nach 2.3.2.2.b bestimmt.

500 µl Kolthoff-Puffer (pH 7,8; 0,1 mM Zn^{2+} ; 0,1 M NaCl) wurden mit 50 µl Enzymlösung bei 40°C versetzt, 15 Minuten bei dieser Temperatur vorinkubiert und dann die Reaktion durch die Zugabe von 250 µl 6 mM Leu-p-NA in 10 mM HCl gestartet.

2.3.7. Einfluß von Metallchelatoren

10 ml Aminopeptidaselösung (0,1 mg/ml) wurden 64 h gegen insgesamt 15 l Kolthoff-Puffer (pH 7,8, 0,1 M NaCl) dialysiert.

100 µl so erhaltener Enzymlösung wurden 15 Minuten bei 40°C mit 700 µl Puffer, der die erforderliche Konzentration an Metallchelatoren enthielt vorinkubiert und die Reaktion dann durch die Zugabe von 200 µl 100 mM Leu-Gly-Gly gestartet.

2.3.8. Modifizierungsreaktionen (149)

2.3.8.1. Modifizierung mit

- a) 1-H-Diazotetrazol, b) Tetranitromethan, c) Phenylmethylsulfonylfluorid, d) Diäthylpyrocarbonat, e) N-Äthylmaleinimid, f) Acetanhydrid, g) Bernsteinsäureanhydrid und
- h) Jodacetamid.

Die Aminopeptidaselösungen (0,2 mg/ml) wurden 24 h gegen 10 l Kolthoff-Puffer (pH 7,8; 0,1-M NaCl; 5×10^{-5} M Zn^{2+}) bei 4°C dialysiert. 180 µl dieser Enzymlösung wurden mit 20 µl Modifizierungsreagenz verschiedener Konzentrationen (in Methanol oder Aceton gelöst) versetzt und wie folgt behandelt:

a) und d) 1 h bei Raumtemperatur, f) und g) 2 h bei Raumtemperatur, e) 30 Minuten, b) 4 h bei Zimmertemperatur und c) über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurden die Restaktivitäten bestimmt wie in 2.3.2.2. a beschrieben.

1-H-Diazotetrazol erhielt man durch Diazotierung von 5-Aminotetrazol mit Natriumnitrit nach (150) in Lösung, die sofort nach der Herstellung verwendet wurde.

2.3.8.2. Photooxidation

Nach 2.3.3. wurde zinkfreies Enzym dargestellt.

Zu der Enzymlösung wurde eine wäßrige Lösung von Methyleneblau gegeben, so daß die Endkonzentration an Methyleneblau 0,025% betrug.

Als Lichtquelle bei der Photooxidation diente eine Lampe, wie sie auch bei der Polymerisation von Polyacrylamidgelen Verwendung findet.

Über der Lampe war in einem Abstand von 8 cm eine lichtdurchlässige Platte angebracht, auf der die Proben in 4 ml-Glasfläschen standen.

Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Restaktivitäten sofort bestimmt.

2.3.9. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei Routinemessungen aus dem Extinktionsverhältnis E_{280}/E_{260} nach WARBURG und CHRISTIAN (151).

Die auf diese Weise erhaltenen Werte stimmten für gereinigte Aminopeptidase I gut mit den Werten überein, die man aus der Aminosäureanalyse erhielt, während die Mikro-Biuret-Methode (152) stets höhere Proteinwerte ergab.

2.3.10. - Zink - Bestimmung

Zur Bestimmung des Zink-Gehaltes der Amino-peptidase I wurde eine Enzymisolierung gemäß 3.1. durchgeführt, jedoch ohne daß den dort erwähnten Puffern Zink zugesetzt wurde, wie es normalerweise der Fall war.

Die Enzymlösungen wurden 1 Woche gegen 20 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,2) dialysiert unter häufigen Wechsels der Pufferlösungen, die zur Entfernung geringster Spuren Zink mit Dithizon in Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt wurden. Die Verwendung von Glasgeräten wurde vermieden. Alle verwendeten Geräte - Erlenmeyerkolben, Eppendorf-Spitzen usw. - wurden vorher zunächst mit 1 mM EDTA-Lösung, dann mit bidest. Wasser gewaschen.

Zum Vergleich mit der so erhaltenen Enzymlösung wurde auch der Zink-Gehalt von EDTA behandeltem Enzym, wie es in 2.3.3. beschrieben wurde, bestimmt.

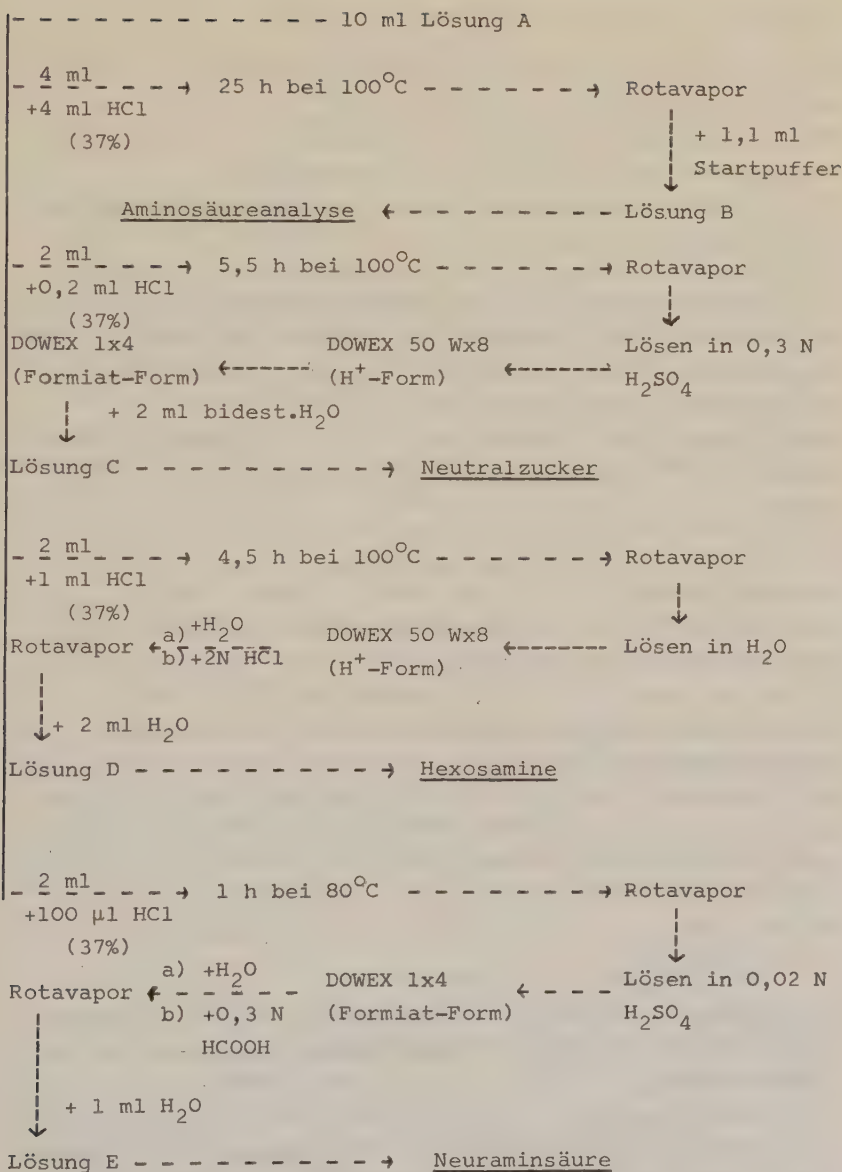
Die dialysierten Amino-peptidasestammlösungen wurden mit zinkfreiem Puffer verdünnt und die Zinkkonzentrationen durch Atomabsorptionsspektroskopie mit Hilfe des in 2.1. aufgeführten Atomabsorptionsspektrophotometers bestimmt.

Als Standard dienten Lösungen verschiedener Konzentrationen von Zinkacetat in bidestilliertem Wasser.

Zur genaueren Proteinbestimmung wurden Proben des analysierten Enzyms hydrolysiert und einer Aminosäureanalyse unterworfen.

2.3.11. - Zuckerbestimmung

An DEAE-Cellulose rechromatographiertes und mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle konzentriertes Enzym wurde 4 x 12 h gegen jeweils 200 ml 80 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5, dialysiert. Die so erhaltene Enzymlösung wurde mit Puffer auf 20 ml verdünnt. Die resultierende Lösung A wies eine Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml auf bei einem E_{280}/E_{260} - Verhältnis von 1,7. Sie wurde wie folgt behandelt:



Zur genaueren Bestimmung des Verhältnisses von Protein zu Zucker wurde mit Lösung B eine Aminosäureanalyse durchge-

führt..

Mit der Lösung C wurden mit der Anthron-Reaktion die Neutralzucker bestimmt (153).

Für die Auswertung der Meßwerte wurden Eichkurven mit Galaktose und Mannose im Verhältnis 1:1 aufgestellt.

200 µl einer Lösung von 0-125 µg/ml in Wasser wurden zu 1 ml Anthron-Reagenzlösung (schwefelsaure Lösung von Anthron und Thioharnstoff) gegeben. Die erhaltenen Lösungen wurden sorgfältig gemischt, die Reaktionsgefäße mit Glaskugeln verschlossen und dann 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wurden sie 20 Minuten in Eiswasser abgekühlt und die Extinktionen bei 620 nm gemessen.

Freie Glucose wurde enzymatisch mit einer BIOCHEMICA-TEST-Kombination (Blutzucker GOD-Perid,Boehringer,Mannheim) bestimmt.

Mit der Lösung D wurden die Hexosamine mit der ELSON-MORGAN-Reaktion bestimmt wie sie von GATT und BERMAN (154) beschrieben wurde. Zur Aufstellung der Eichkurve wurde Glucosamin-Hydrochlorid verwendet.

0,6 ml der Proben D in 2 N HCl wurden mit 0,4 ml 2M Na₂CO₃ neutralisiert und dann mit 0,5 ml 2%-igem Acetylaceton (frisch dest.) in 1,5 M Na₂CO₃ versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden mit Glaskugeln verschlossen und dann 20 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zunächst 1 ml Äthanol und dann 0,5 ml einer Lösung von 1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 30 ml Äthanol/konz. HCl (1:1) zugefügt. Nach 10 Minuten wurden die Extinktionen bei 530 nm gemessen.

Die Bestimmung der Neuraminsäure erfolgte nach der RESORCIN-Methode (155) mit Lösung E, wobei N-Acetyl-Neuraminsäure als Standard diente.

Zu 1 ml Zuckerlösung (200 - 400 µg/ml) in Wasser gab man 2 ml Resorcin-Reagenz (2 gResorcin in 100 ml Wasser, 10 ml davon + 80 ml konz.HCl + 0,25 ml 0,1 M CuSO₄, aufgefüllt auf 100 ml ml mit Wasser). Die Reaktionsgefäße wurden wiederum mit Glaskugeln verschlossen und dann 15 Minuten im siedenden

Wasserbad erwärmt. Man kühlte danach in Eiswasser, fügte 5 ml iso-Amylalkohol (frisch dest.) hinzu und schüttelte gut durch. Dann stellte man die Proben ins Eisbad. Nach ca. 5 Minuten wurden die Extinktionen bei 580 nm gemessen.

2.3.12. DISC - Elektrophoresen ohne und mit SDS

a) ohne SDS

Die DISC-Elektrophoresen wurden gewöhnlich nach der Vorschrift von MAURER (156) bei pH 8,9 durchgeführt. Man verwendete 5%-ige Polyacrylamidgele mit 0,2% Methylen-bis-Acrylamid als Quervernetzer. Die Polymerisation erfolgte mit Ammoniumpersulfat.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau in Wasser/Methanol/Eisessig 5:4:1 angefärbt. Zur Lagerung und gleichzeitig zur Intensivierung der Banden wurden die Gele in 7,5%-ige Essigsäure gelegt.

Zum Vergleich der Proteinverteilung mit der Amino-peptidase-aktivität wurden die Gele in Gegenwart von Fast Blue B-Salz mit Leu- β -Naphthylamid behandelt (157).

Die Sichtbarmachung von Glykoproteinen erfolgte durch Behandlung der Gele mit Perjodsäure und SCHIFFS Reagenz (177).

b) mit SDS, Molekulargewichtsbestimmungen

Die SDS-Elektrophoresen wurden bei pH 7,0 mit 7,5%-igen Polyarylamidgelen nach der Vorschrift von WEBER und OSBORN (158) durchgeführt.

Die Amino-peptidase I wurde entweder gegen 5 mM Ammonium-acetattuffer (pH 6,2) dialysiert und anschließend lyophilisiert, oder aber gegen Phosphattuffer vom pH 5,8 (0,1 M) dialysiert und nachfolgend mit Aceton (30 v/v) gefällt, wie es unter 3.1.5. beschrieben wird.

Schließlich wurden auch noch konzentrierte Enzymlösungen mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle (Membran PM 10) erhalten.

Die stark konzentrierten Enzymlösungen wurden mit Inkubationspuffer verdünnt, feste Amino-peptidase I wurde im Inkubationspuffer gelöst und durch Zentrifugieren vom Unlöslichen befreit.

Vor dem elektrophoretischen Lauf wurden die Proben im Inkubationspuffer unterschiedlich lange bei 40°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 8 mA pro Röhrchen bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Proteinbanden wie oben beschrieben angefärbt.

Die relative elektrophoretische Beweglichkeit der Proben wurde mit denen von Eichproteinen verglichen. Als solche dienten β -Galactosidase (E.coli), Phosphorylase A (Kaninchenmuskel), Katalase (Rindermilz), Lactat-Dehydrogenase, Chymotrysinogen, Lysozym und Myosin, die ebenfalls im Inkubationspuffer gelöst und dann einen Tag lang bei Zimmertemperatur stehengelassen wurden, bevor sie der Elektrophorese unterworfen wurden.

2.3.13. - Isoelektrische Fokkussierung

Hier wurden Saccharose-Gradienten mit 1%-iger Ampholine, pH 4-6, in einer LKB-Säule verwendet.

Da Ampholine die Amino-peptidaseaktivität stark herabsetzt, wurden die einzelnen Fraktionen nach der Fokkussierung zunächst dialysiert bevor die Aktivitätsmessung nach 2.3.2.2.a erfolgte.

2.3.14. - Aminosäureanalysen

wurden nach den in der Literatur beschriebenen Methoden (159,160) mit einem BECKMANN MULTICHROM B Flüssigkeits-säulenchromatographen durchgeführt.

Festsubstanzen wurden mit 6 N HCl versetzt, Flüssigkeiten mit dem gleichen Volumen konzentrierter HCl.

Nach dem Begasen mit Argon wurden die Glasröhrchen abgeschmolzen und dann 24 h im Trockenschrank bei 110°C ge-

halten. Nach dem Abkühlen wurden die Flüssigkeiten in Rundkolben überführt und die Salzsäure bei 30°C im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Der feste Rückstand wurde dann mit Probenauftragepuffer (Citratpuffer, pH 2,2; Herstellung nach der Bedienungsanleitung der Firma Beckmann) gelöst und zur Analyse auf den Analysator gegeben.

Zur Bestimmung von Tryptophan wurde der Hydrolysemischung 5% Thioglykolsäure zugefügt (161).

Cystein und Methionin wurden mit Perameisensäure oxidiert und als Cysteinsäure und Methioninsulfoxid bestimmt (162).

Der Verlust von Serin und Threonin während der Hydrolyse wurde berücksichtigt, indem man die Proteinproben unterschiedlich lange hydrolysierte (17-38 h) und aus der erhaltenen Kurve (μ Mole Ser und Thr gegen Hydrolysedauer aufgetragen) auf den Gehalt des Proteins an diesen beiden Aminosäuren zur Hydrolysezeit null extrapolierte.

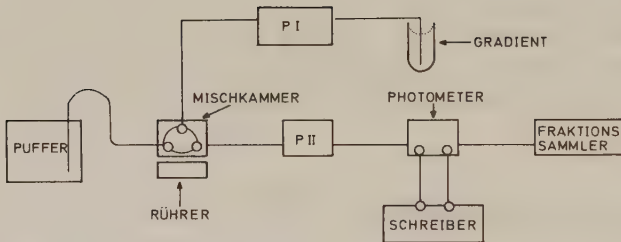
2.3.15. Dichtegradienten - Zentrifugationen

Die Dichtegradientenzentrifugationen wurden gemäß MARTIN und AMES (163) durchgeführt. Verwendet wurden 5 ml 5-20%-ige Sucrose-Gradienten in dem SW 50L-Rotor der Spinco L2-Ultrazentrifuge. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Gradienten fraktioniert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte des Gradienten ist bei normaler tropfenweiser Fraktionierung das Volumen der Tropfen verschieden, was die Auswertung verfälscht. Dieser Effekt wurde wie folgt vermieden:

Die Fraktionierung erfolgte mit Hilfe zweier peristaltischer Pumpen und einer Mischkammer. Die Pumpe I diente dazu, den Gradienten in die Mischkammer zu pumpen, wo er durch Rühren (Magnetrührer) mit dem entsprechenden Puffer verdünnt wurde, der mit Hilfe der Pumpe II in die Mischkammer gesaugt wurde. Durch Variation des Verhältnisses der Pumpleistungen kann man jede gewünschte Verdünnung des Gradienten erhalten. In den hier durchgeführten Fraktionierungen wurde der Gra-

dient 1:10 mit Puffer verdünnt.

Von der Mischkammer gelangte der Gradient vermittels Pumpe II zu Photometer mit Durchflußküvette und schließlich zum Fraktionssammler. Konstante Fraktionsvolumina wurden mit Hilfe eines Tropfenzählers erhalten.



2.3.16. Kinetik

Sämtliche kinetische Messungen wurden mit an DEAE-Cellulose rechromatographiertem Enzym durchgeführt. Die Messungen der Aktivitäten erfolgte nach 2.3.2.2. a in Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer (pH 7,8; 0,1 M NaCl; 5×10^{-5} M Zn^{2+}).

Bei der Untersuchung des Einflusses von Zink und Bromid auf die Kinetik der Spaltung des Tripeptides Ala-Thr-Ala-OME enthielt der obige Puffer die in den Abbildungen 43 a und b angegebenen Aktivatorkonzentrationen (siehe Ergebnisse: Kinetik).

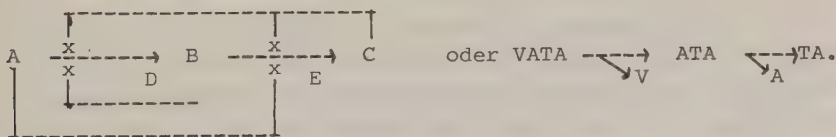
Es wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Peptidhydrolysen gemessen. Mit den erhaltenen Meßwerten wurden die kinetischen Daten mit Hilfe eines Computerprogrammes berechnet (64).

Die in den Abbildungen 43 a und b dargestellten Kurven stellen die vom Computer berechneten Fits der HILL-Gleichung

$$v = \frac{V (S)^{n_H}}{K + (S)^{n_H}}$$

an die Meßpunkte dar.

Der Computersimulation der Spaltung des Tetrapeptides Val-Ala-Thr-Ala (164) wurde folgendes Reaktionsschema zugrunde gelegt:



Von dem obigen Tetrapeptid werden successiv die Aminosäuren Valin und Alanin abgespalten. Das Endprodukt der Spaltung ist das Dipeptid Thr-Ala, das als Inhibitor bei der Hydrolyse sowohl des Tetrapeptides als auch des Tripeptides wirkt. Daneben hemmt ATA die Spaltung von VATA und dieses wiederum die von ATA.

3. REINIGUNG DER AMINOPEPTIDASEN I UND II AUS HEFE

3.1. Aminopeptidase I

Zur Isolierung der Aminopeptidase I wurde frisch gepresste Bierhefe der MARBURGER BRAUEREI, Marburg, verwendet. Die Bierhefe wird zunächst zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann sogleich der Autolyse unterworfen, oder aber zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren. Das Einfrieren hat keinerlei negativen Einfluß auf die Enzymausbeute, wenn man die Hefe vor dem Autolyseschritt bei Zimmertemperatur langsam auftauen läßt.

Die im folgenden beschriebene Reinigung der Aminopeptidase I bezieht sich auf 3 kg gepresster Bierhefe, die wie oben beschrieben vorbehandelt worden ist.

Alle Reinigungsoperationen außer der Autolyse und der Hitze-fällung erfolgen bei 4°C .

3.1.1. Autolyse

Durch sorgfältiges Kneten der Hefe mit 300 ml Essigester in einem 5l-Becher wird diese zunächst verflüssigt. Anschließend rührt man die Mischung noch etwa 10 Minuten, um sie dann mit 3 l 0,2 M Ammoniumacetatpuffer (pH 6,3; 0,1 mM Zn^{2+}) zu versetzen. Die erhaltene Suspension wird langsam gerührt, wobei man den pH durch eventuelle Zugabe von 10%-iger Ammoniaklösung konstant hält.

Nach 2 h wird zunächst 30 Minuten lang bei 1 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Hefezellen nochmals in 3 l des obigen Puffers suspendiert. Nach dem Überschichten mit Toluol bleibt die Suspension 64-72 h bei Raumtemperatur stehen, wobei man gelegentlich umrührt.

Wieder wird jetzt 30 Minuten bei 1 500 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen und die leicht trübe, dunkelbraune Lösung für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

3.1.2. Ammoniumsulfat - Fällung

Die Lösung wird nun innerhalb von 2 h zu 50% mit feingemörsertem Ammoniumsulfat (313 g/l) gesättigt. Man läßt 2 h bei 4°C stehen und entfernt dann durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 x g das ausgefallene Protein.

Der Überstand wird nun durch langsame Zugabe von weiterem Ammoniumsulfat zu 70% gesättigt (weitere 137 g/l). Man läßt über Nacht stehen und zentrifugiert dann wie oben beschrieben. Der Niederschlag wird zweimal mit 70%-iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen (enthält 1 mM Zn^{2+}) und dann in möglichst wenig 0,2 M Ammoniumacetatpuffer (pH 6,3; 1 mM Zn^{2+}) gelöst. Man erhält eine dunkelbraune Lösung, die ohne weitere Behandlung der Hitzefällung unterworfen wird.

3.1.3. Hitzefällung

Diese wird in einem von RÖHM (63) beschriebenen Gefäß durchgeführt, das sich in einem Wasserbad von 60°C befindet. Die Proteinelösung von 3.1.2. wird möglichst rasch in den Raum zwischen den beiden Glassäulen eingefüllt und gut gerührt. Genau 2 Minuten nach dem Einfüllen der Proteinelösung wird das ganze Gefäß aus dem Wasserbad entfernt und in ein Eisbad gestellt. Zum rascheren Abkühlen wird weiterhin gerührt. Nach wenigstens 30 Minuten wird der voluminöse Niederschlag durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 x g entfernt.

3.1.4. Chromatographie an Sephadex G-150

Der Überstand von 3.1.3. wird nun auf eine 10 x 105 cm Sephadex G-150-Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 mM Tris/Succinat-Puffer (pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+}) äquilibriert worden ist. Um störende Effekte durch noch vorhandenes Ammoniumsulfat zu verringern, erfolgt die Chromatographie an der Säule von unten nach oben.

Es wird mit dem eben erwähnten Tris/Succinat-Puffer mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 100 ml/h eluiert, wobei 25 ml-Fractionen gesammelt werden.

Aminopeptidaseaktivität erscheint kurz nach dem Ausschluß-

volumen der Säule (etwa 1,3 l).

Die aktiven Fraktionen werden gesammelt. Das Volumen der vereinigten Fraktionen beträgt zwischen 600 ml und 1 l, wobei die Lösung noch immer hellbraun gefärbt und manchmal etwas trüb ist. Sie wird ohne weitere Behandlung für die Acetonfällung weiterverwendet.

3.1.5. - Aceton - Fällung

Die oben erhaltene Enzymlösung wird zunächst mit 2 N Essigsäure auf pH 5,8 gebracht und dann in einem Rundkolben mit Hilfe eines Kyrastaten auf -2°C abgekühlt. Nun tropft man auf -15°C gekühltes, destilliertes Aceton unter Rühren der Proteinlösung so zu, daß sie nach 4-5 h zu 30% mit Aceton gesättigt ist (v/v).

Ist etwa ein Drittel des benötigten Acetons zugetropft, so kühlt man die Lösung auf -5 bis -7°C ab. Nach beendeter Acetonzugabe läßt man die Suspension 1 bis 2 h bei dieser Temperatur stehen (ohne Rühren) und zentrifugiert dann 30 Minuten bei 10 000 x g bei 0°C .

Der Niederschlag wird in möglichst wenig des erwähnten Tris-Puffers gelöst, das Unlösliche durch Zentrifugation (10 Minuten bei 10 000 x g abgetrennt).

Anschließend wird die braune Lösung über Nacht bei 4°C gegen ca. 5 l des obigen Puffers dialysiert.

3.1.6. - Chromatographie an DEAE - Cellulose

Die dialysierte Enzymlösung wird nun an einer DEAE-Cellulose-Säule (2x40 cm) chromatographiert.

Die Säule wird zuvor mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h mit dem obigen Tris/Succinat-Puffer äquilibriert.

Nach dem Auftragen des Enzyms wird die Säule mit demselben Puffer gewaschen bis die Extinktion bei 280 nm auf den Ausgangswert abgesunken ist.

Die Elution wird dann mit 500 ml eines linearen Natriumchloridgradienten (0-500 mM, im gleichen Puffer) durchge-

führt. Die vereinigten aktiven Fraktionen werden dann über Nacht gegen Tris/Succinat-Puffer dialysiert.

3.1.7. _Rechromatographie an DEAE - Cellulose

Die dialysierte Amino-peptidase-Lösung wird durch Zugabe von festem Natriumchlorid auf eine Natriumchloridkonzentration von 80 mM gebracht, was durch Leitfähigkeitsmessungen kontrolliert wird, und mit einer Geschwindigkeit von 40 ml/h auf eine 2 x 10 cm - DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen (mit 10 mM Tris/Succinat-Puffer, pH 7,3, 0,1 mM Zn^{2+} , 80 mM NaCl äquilibriert). Mit dem gleichen Puffer wird die Säule bis zur konstanten Extinktion bei 280 nm gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem konkaven Natriumchlorid-Gradienten (80 - 300 mM) in dem erwähnten Tris/Succinat-Puffer. Die aktivsten Fraktionen werden gesammelt, und die Enzym-Lösung mit Hilfe einer Amincon Ultrafiltrationszelle (Membran PM 10) auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt.

3.1.8. _Gelfiltration an Sepharose 6B

Die in 3.1.7. erhaltene konzentrierte Enzym-Lösung wird darauf auf eine Sepharose 6B - Säule (2 x 50 cm) aufgetragen, die mit 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,2, äquilibriert worden ist.

Die Elution erfolgt mit dem gleichen Puffer mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h.

Die gesammelten aktiven Fraktionen werden zur Aufbewahrung bei $-20^{\circ}C$ (ohne sonstige Zusätze) eingefroren.

3.2. Amino-peptidase I nach GRASSMANN (16), modifiziert

3.2.1. _Autolyse

3 kg gepreßter Bierhefe werden mit 300 ml Essigester verflüssigt. Nach der Zugabe von 3 l destilliertem Wasser bringt man die Suspension mit 10%-iger Ammoniaklösung auf pH 7. Man rührt 2,5 h bei Zimmertemperatur und zentrifugiert

dann 30 Minuten bei 1 500 x g. Der Überstand wird verworfen, die Hefezellen in 2,5 l 0,1M Tris/Succinat-Puffer (pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+}) resuspendiert und mit 3 g Papain versetzt, das in dem Autolysepuffer zuvor aufgeschlämmt worden ist. Man rührt noch 30 Minuten, überschichtet mit Toluol und läßt dann 48 h bei Zimmertemperatur stehen, wobei der pH durch Zugabe von Ammoniaklösung konstant gehalten wird. Nun wird in der gleichen Weise wie oben zentrifugiert und der Niederschlag verworfen.

Die dunkelbraune bis schwarze Lösung läßt man stehen bis sie auf Raumtemperatur gekommen ist.

3.2.2. Essigsäure - Fällung

Unter starkem Rühren mit einem Magentrührer wird die Proteinlösung bei Zimmertemperatur solange mit 2 N Essigsäure versetzt, bis der pH der Lösung 4,5-4,7 beträgt (300-450 ml). Die Essigsäurezugabe kann anfangs schnell erfolgen, ab pH 5 muß sie jedoch langsam durchgeführt werden.

Die Suspension wird etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Rühren stehengelassen. Sodann wird 30 Minuten mit 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag in ca. 750 ml eiskaltem Wasser, das mit einigen Tropfen Essigsäure auf pH 5 gebracht worden ist, suspendiert und dann wie oben zentrifugiert (10 Minuten). Nun wird der Proteinniederschlag in ca. 300 ml 0,1 M Tris/Succinat-Puffer (pH 7,5; 0,1 mM Zn^{2+}) suspendiert, wobei ein Teil des Proteins bereits in Lösung geht. Unter starkem Rühren wird nun der pH der Lösung kontrolliert und der Rest des Proteins durch Zugabe von ca. 2%-iger Ammoniaklösung in Lösung gebracht. Dabei schlägt die Farbe der Lösung von zunächst hellbraun nach dunkelbraun bis schwarz um.

Der pH der Lösung beträgt schließlich 7,5 - 7,8.

Vom Unlöslichem wird abzentrifugiert (10 Minuten mit 10^4 x g) und die Lösung auf 4°C abgekühlt.

3.2.3. Natriumacetat - Fällung

Die obige Proteinlösung wird nun bei 4°C innerhalb von 2 h

unter Rühren mit feingemörsertem Natriumacetat versetzt (40 g/100 ml). Man läßt über Nacht stehen und fügt wiederum unter Rühren langsam festes Ammoniumsulfat hinzu, bis die Lösung an Ammoniumsulfat gesättigt ist. Man beendet das Rühren und läßt die Suspension ca. 2 - 3 h bei 4°C stehen. Danach wird der Niederschlag durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 x g abgetrennt.

Anschließend wird die dunkelbraune Lösung zunächst 5 h gegen kaltes fließendes Leitungswasser, danach 60 h gegen insgesamt 20 l 0,2 M Phosphatpuffer (pH 5,8; 0,1 mM Zn^{2+}) in 2 Portionen dialysiert. Danach ist der größte Teil des Ammoniumsulfates aus der Lösung entfernt, deren pH nun durch Zugabe von 2 N Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt wird.

3.2.4. Aceton - Fällung

Die sich anschließende Aceton-Fällung (30% v/v) erfolgt wie bereits unter 3.1.5. beschrieben.

Der Proteinniederschlag wird durch Zentrifugation (30 Min. bei 10 000 x g bei 0°C) abgetrennt und in möglichst wenig 10 mM Tris/Succinat-Puffer (pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+}) gelöst. Das unlösliche Protein wird durch Zentrifugation (wie oben, 10 Minuten) entfernt und die nunmehr klare dunkelbraune Lösung über Nacht gegen den obigen Puffer dialysiert.

3.2.5. Chromatographie an DEAE - Cellulose

Die Chromatographie wird an einer DEAE-Cellulose-Säule (hier 2 x 20 cm), wie unter 3.1.7. beschrieben, durchgeführt. Die Elution erfolgt mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (80 -400 mM, 500 ml) in dem erwähnten Puffer. Wie unter 3.1.7. wird das Enzym auch hier konzentriert.

3.2.6. Chromatographie an SEPHADEX G-200

Die konzentrierte Enzymlösung wird nun auf eine Sephadex G-200 - Säule (2 x 100 cm), die oben und unten jeweils mit einem Pufferadapter versehen ist, aufgetragen. Die Säule wird zuvor mit dem obigen Tris/Succinat-Puffer äquilibriert.

Eluiert wird mit einer Geschwindigkeit von ca. 8 ml/h. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und bei -20°C in der Kühltruhe aufbewahrt.

3.3. Aminopeptidase I nach JOHNSON (1)

3.3.1. Autolyse

Die Autolyse erfolgt hier wie bereits unter 3.1.1. beschrieben. Sie wird nach 72 h unterbrochen. Als Ausgangsmaterial wird 1 kg Bierhefe verwendet.

Das Autolysat wird mit 2 N Essigsäure auf pH 5,8 gebracht. Sodann erfolgt die

3.3.2. Aceton - Fällung I,

die wie unter 3.1.5. beschrieben durchgeführt wird.

Nach dem Abtrennen des Proteinniederschlages wird dieser in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,8, gelöst, vom Unlöslichen abzentrifugiert, und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.

3.3.3. Ammoniumsulfatfällung

Diese wird wie unter 3.1.2. durchgeführt, der erhaltene Niederschlag der 50-70%-igen Sättigung im erwähnten Phosphat-Puffer gelöst und die Lösung über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.

3.3.4. Aceton - Fällung II

Nach der Korektur des pH-Wertes der Lösung wird nochmals eine Acetonfällung (30% v/v) durchgeführt, wie sie unter 3.1.5. beschrieben worden ist.

3.4. Aminopeptidase II aus Bierhefe

3.4.1. - 3.4.4. Autolyse, Ammoniumsulfat-Fällung, Hitze-Fällung, Chromatographie an SEPHADEX G-150

Alle aufgeführten Reinigungsschritte erfolgten wie unter 3.1.1. bis 3.1.4. beschrieben, die Autolyse wird allerdings schon nach 20 h beendet.

Die Aminopeptidase II wird zusammen mit der Dipeptidase (63) von der Sephadex-Säule eluiert.

3.4.5. Chromatographie an DEAE - Cellulose

Die gesammelten aktiven Fraktionen der Hefedipeptidase, die auch die Aminopeptidasaktivität enthalten, werden mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 40 cm) aufgetragen, die mit 10 mM Tris/Succinat-Puffer (pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+}) äquilibriert worden ist.

Die Säule wird zunächst solange mit Puffer gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm konstant ist. Dann erfolgt die Elution mit 600 ml eines linearen Natriumchlorid-Gradienten (0 bis 0,5 M NaCl).

Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und bei $-20^{\circ}C$ in der Kühltruhe aufbewahrt.

3.4.6. Gelfiltration an SEPHAROSE 6B

Eine Probe der Aminopeptidase II wird mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle konzentriert. Anschließend erfolgt eine Gelfiltration an Sepharose 6B (2 x 29 cm).

Äquilibrierung und Elution werden mit dem obigen Tris/Succinat-Puffer durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Reinigung der Aminopeptidase I

Eine Übersicht über die Aufarbeitungsgänge zur Anreicherung der Aminopeptidase I aus Bierhefe ist in den Tabellen III, IV und V gegeben.

In verschiedenen Versuchen wurde festgestellt, daß für die optimale Freisetzung der Aminopeptidase I eine Autolysedauer von 72 h nötig ist. Nach 48 h ist etwa nur die Hälfte des Enzyms freigesetzt, nach 24 h nur ein Drittel (bezogen auf eine Autolysedauer von 72 h).

Für die Hefedipeptidase ist eine Autolysedauer von 72 h jedoch nicht empfehlenswert. Sollen beide Enzyme gleichzeitig aufgearbeitet werden, so muß bezüglich der Autolysedauer ein Kompromiß geschlossen werden.

Eine andere Möglichkeit besteht in der fraktionierten Autolyse und getrennter Aufarbeitung beider Enzyme: Zentrifugation des Autolysates nach 24 h und Resuspension des Niederschlages mit erneuter Autolyse für weitere 48 h.

Die der Autolyse nachfolgenden zwei Reinigungsschritte, Ammoniumsulfat- und Hitzegefällung, dienen zur Entfernung eines großen Teils des inaktiven Proteins. Die Aminopeptidaseausbeuten bei der Ammoniumsulfatfällung schwanken um 70%. Die Hitzegefällung bringt für die Anreicherung der Aminopeptidase I keinen großen Vorteil, ist jedoch für die weitere Beständigkeit der Dipeptidase unerlässlich (63). Sollen Aminopeptidase und Dipeptidase nebeneinander aufgearbeitet werden, so ist dieser Schritt empfehlenswert.

Durch die Gelfiltration an Sephadex G-150 wird die Aminopeptidase I von der Aminopeptidase II, von der Dipeptidase und von weiteren Proteinen abgetrennt.

Der größte Teil der ursprünglichen Aminopeptidaseaktivität im Autolysat erscheint als ein Peak (AP I) kurz nach dem Ausschlußvolumen der Säule (Abb. 1 und 2). Ein wesentlich kleinerer Peak von Aminopeptidaseaktivität erscheint zu-

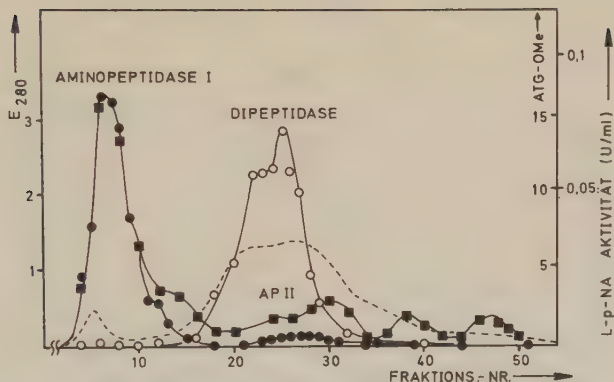


Abbildung 1: Chromatographie an Sephadex G-150

Eine Probe eines 70% Ammoniumsulfatniederschlages wurde in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,3, gelöst und auf eine 2,5 x 100 cm Sephadex G-150-Säule aufgetragen. Äquilibration und Elution erfolgten mit dem gleichem Puffer. Die Extinktionen bei 280 nm (---) und die Aktivitäten gegen Leu-p-Nitro-anilid (■---■), Ala-Thr-Gly-OMe (●---●) und Gly-Leu (○---○) wurden gemessen wie unter "Methoden" beschrieben.

Gesammelt wurden 2,5 ml pro Fraktion.

(Die Säulendimension und der verwendete Puffer entsprachen in diesem analytischen Lauf nicht den bei den präparativen Gelfiltrationen an Sephadex G-150 angewendeten Bedingungen.)

sammen mit der Dipeptidase. Wegen des im Vergleich zu der zuerst erscheinenden Amino-peptidase geringeren Molekulargewichtes wurde diese Amino-peptidase mit II (AP II) gekennzeichnet.

Sie unterscheidet sich von der AP I durch geringeres Molekulargewicht und in ihrer Substratspezifität (siehe Ergebnisse).

Die der Gelfiltration folgende Acetonfällung ist unproblematisch. Zu beachten ist jedoch, daß der pH-Wert der Enzymlösung etwa 5,7 bis 5,9 beträgt. In diesem pH-Bereich wurden bei verschiedenen Acetonfällungen keine Unterschiede

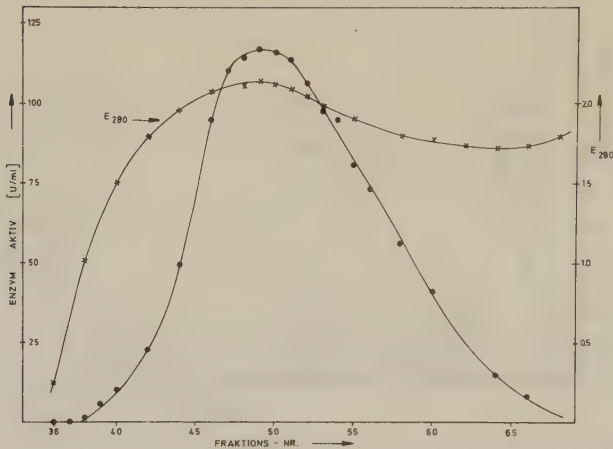


Abbildung 2: Präparative Gelfiltration von Amino-peptidase I an Sephadex G-150 (10 x 105 cm).

Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+}

Fraktionsvolumen: 20 ml

(X—X) E_{280} , (●—●) Aktivität gegen Leu-Gly-Gly.

bezüglich Anreicherung und Enzymausbeute gefunden. Beträgt der pH der Lösung jedoch 5,9, so fällt auch bei 30%-iger Sättigung mit Aceton nur wenig Enzym aus. Will man jetzt durch Zugabe von verdünnter Essigsäure den pH korrigieren, so wird das Enzym irreversibel inaktiviert. Obwohl die Anreicherung bei der Acetonfällung nicht sehr groß ist, ist ihre Durchführung aufgrund des geringen Enzymverlustes (nur etwa 10-20%) lohnend, da die Enzymausbeuten bei der nachfolgenden Chromatographie an DEAE-Cellulose größer sind, was darauf zurückzuführen ist, daß ohne Acetonfällung das Volumen der auf die DEAE-Cellulose-Säule aufzutragenden Enzymlösung recht groß ist.

Bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose (siehe Abb.3) wird im allgemeinen eine 3-4-fache Anreicherung erzielt. Eine große Menge Fremdprotein wird von der Säule bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,6 M eluiert, während die Amino-peptidase bei einer Natriumchloridkonzentration von 80 bis 250

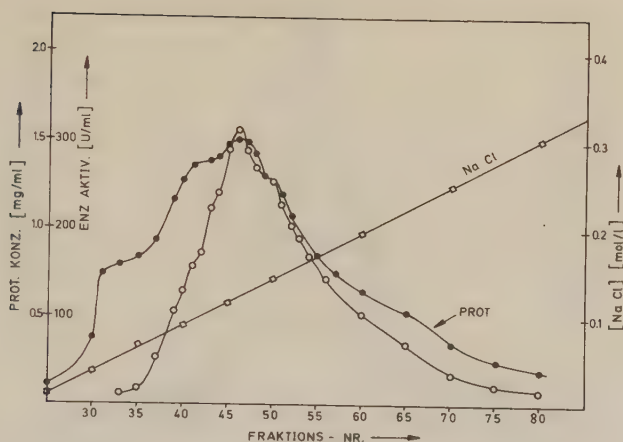


Abbildung 3: Chromatographie an DEAE-Cellulose (2 x 40 cm). -
Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} .

Fraktionsvolumen: 5 ml

(●—●) Protein, (○—○) Aktivität gegen Leu-Gly-Gly und
(□—□) NaCl - Gradient.

mM erscheint.

Zur Verkürzung des Reinigungsverfahrens wurde auch versucht, die erste Chromatographie an DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren durchzuführen. Nach der Adsorption an der DEAE-Cellulose (1 h bei 4°C rühren) wurde zunächst mit 0,1 M NaCl im üblichen Tris/Succinat-Puffer gewaschen und dann das Enzym durch Behandeln der DEAE-Cellulose mit 0,5 M NaCl im gleichen Puffer eluiert.

Die Enzymausbeute bei dieser Methode betrug jedoch nur etwa 35%, daher wurde in den weiteren Präparationen auf die ursprünglich angewendete Säulenchromatographie zurückgegriffen.

Zur Entfernung des Fremdproteins, das bei der ersten Chromatographie an DEAE-Cellulose bei niedrigen NaCl-Konzentrationen auftritt, wird eine Rechromatographie an DEAE-Cellulose durchgeführt (siehe Abb. 4).

Bei diesen Schritt wird das Enzym in Isoenzyme aufgetrennt, die ein ähnliches Elutionsverhalten und nahezu identische spezifische Aktivitäten aufweisen. Die Ursache dieses Poly-

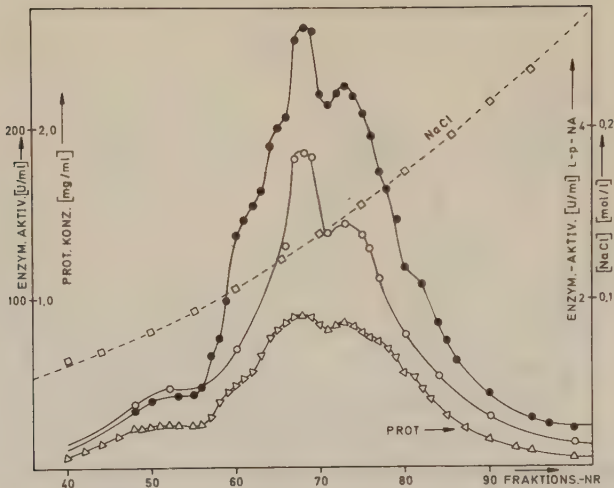


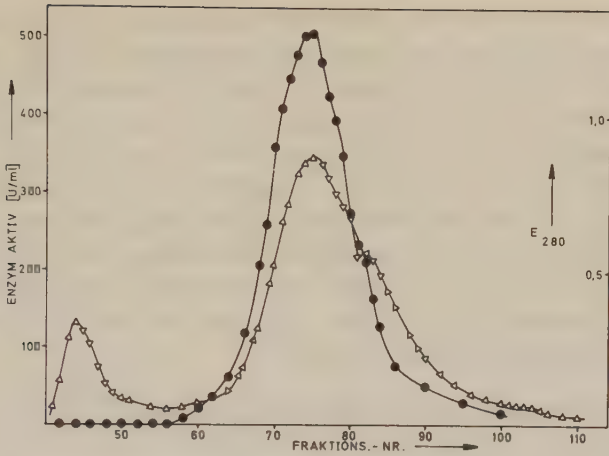
Abbildung 4: Rechromatographie an DEAE-Cellulose (2 x 10 cm). Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} ; 80 mM NaCl. Protein ($\triangle-\triangle$), Volumenaktivität mit Leu-Gly-Gly ($\bullet-\bullet$) und Leu-p-NA ($\circ-\circ$), NaCl-Gradient ($\square--\square$).

morphismus, der unter bestimmten Umständen auch bei der Disc-Elektrophorese auftritt, wird später diskutiert.

Wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist, stimmen bei der Rechromatographie an DEAE-Cellulose Protein- und Aktivitätsverlauf (gegen Leu-Gly-Gly und Leu-p-NA) vollkommen überein.

Eine weitere Erhöhung der spezifischen Aktivitäten läßt sich durch eine Gelfiltration an Sepharose 6B erreichen (Abb.5), bei der die aktive Form des Enzyms mit einem Molekulargewicht von 6×10^5 daltons (siehe 4.8.) von inaktiven Untereinheiten und höhermolekularen Aggregaten, die ebenfalls inaktiv sind, abgetrennt wird.

Bei diesem Reinigungsschritt werden durchschnittliche spezifische Aktivitäten von ca. 800 U/mg für die gesammelten aktiven Fraktionen erreicht.



* Abbildung 5: Gelfiltration an Sepharose 6B (3 x 45 cm).
 Puffer: 50 mM Ammoniumacetat, pH 6,2.
 Fraktionsvolumen: 1,7 ml.
 (Δ—Δ) E₂₈₀, (●—●) Aktivität gegen Leu-Gly-Gly.

Andere Reinigungsmethoden

Wenn auf die Isolierung der Dipeptidase keinen Wert gelegt wird, und nur die Amino-peptidase I gereinigt werden soll, so kann man das Enzym wie unter 3.2. beschrieben aufarbeiten. Die ersten Schritte dieser Reinigungsmethode wurden von GRAßSMANN und Mitarbeitern beschrieben (16).

Durch den Zusatz von Papain zum Autolysat wird die Autolysezeit auf 48 h verkürzt. Die Enzymausbeuten liegen jedoch stets etwas höher als wenn man die Autolyse 72 h ohne Papainzusatz durchführt. Von einer längeren Autolyse ist abzuraten, da dadurch die Enzymausbeuten bei der nachfolgenden Essigsäurefällung erheblich vermindert werden. Die isoelektrische Fällung bei pH 4,5 bis 4,7 ist der kritische Punkt dieser Reinigungsmethode, da die Enzymausbeuten hier von Präparation zu Präparation verschieden sind; sie schwanken zwischen 30 und 75%, während die Dipeptidase bei der Essigsäurefällung vollkommen inaktiviert wird.

Die bei diesem Schritt erreichten spezifischen Aktivitäten

stimmen gut mit den von GRASSMANN beschriebenen überein. Die nachfolgende gekoppelte Natriumacetat/Ammoniumsulfat-Fällung soll nach GRASSMANN hauptsächlich zur Entfernung von Nucleinsäuren führen. Tatsächlich konnte bei diesem Schritt des Extinktionsverhältnis E_{280}/E_{260} vergrößert werden.

Allerdings wurden hier nicht die spezifischen Aktivitäten erreicht, wie sie GRASSMANN bei seinen Präparationen erhielt. Er konnte durch die Natriumacetat/Ammoniumsulfat-Fällung mit nachfolgender Dialyse 10 bis 20-fache Reinheitssteigerungen erzielen, während bei unseren Experimenten nur eine 3-fache Anreicherung zu erreichen war.

Durch die anschließend durchgeführte Acetonfällung, die von GRASSMANN zwar erwähnt, aber nicht näher beschrieben worden ist, erfolgt nochmals eine 7-fache Anreicherung mit sehr geringem Enzymverlust, wie man Tabelle IV entnehmen kann.

Die Abbildung 6 macht ersichtlich, daß das Enzym in diesem Reinigungsstadium noch von einem großen Teil Fremdprotein begleitet ist, das man durch Chromatographie an DEAE-Celulose und Gelfiltration an Sephadex G-200 (Abb. 7) entfernen kann.

Hierbei zeigt das Enzym das gleiche Verhalten wie die Amino-peptidase I, die nach 3.1. isoliert worden ist. Das trifft auch auf die abschließende Gelfiltration an Sepharose 6B zu, bei der das Enzym, das nach GRASSMANN aufgearbeitet worden ist, das gleiche Elutionsverhalten (Auftreten von inaktiven Untereinheiten und inaktiven höhermolekularen Aggregaten) wie die nach 3.1. gereinigte Amino-peptidase I zeigt (vergleiche Abb. 5).

Wie bereits erwähnt, isolierte JOHNSON (1) im Jahre 1941 durch wiederholte Acetonfällungen eine Amino-peptidase mit einem Molekulargewicht von 670 000 daltons aus Hefe.

Wie man aus Tabelle V ersehen kann, führte der Versuch, das Enzym nach dieser Methode zu reinigen, nicht zum Erfolg.

Während JOHNSON bei der ersten Acetonfällung eine 40-fache Anreicherung erzielte, konnten wir die Amino-peptidase I hier

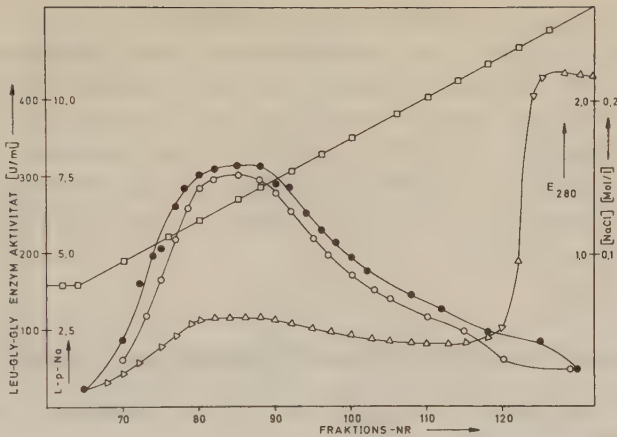


Abbildung 6: Chromatographie der nach GRASSMANN aufgearbeiteten Amino-peptidase an DEAE-Cellulose (2 x 40 cm).
Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} .
Fraktionsvolumen: 5 ml.

(Δ — Δ) E_{280} , Volumenaktivität gegen Leu-Gly-Gly ($\bullet$ — $\bullet$)
und Leu-p-NA ($\circ$ — $\circ$), NaCl-Gradient ($\square$ — $\square$).

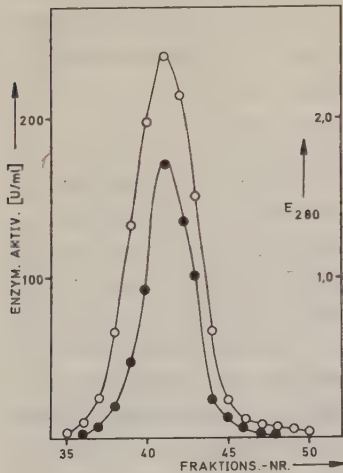


Abbildung 7: Gelfiltration der nach GRASSMANN aufgearbeiteten Amino-peptidase an Sephadex G-200 (2 x 100 cm).
Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} .
Fraktionsvolumen: 3,4 ml.
($\circ$ — $\circ$) E_{280} ,
($\bullet$ — $\bullet$) Volumenaktivität gegen Leu-Gly-Gly.

nur etwa 3-fach anreichern. Daher wurde als nächstes eine Ammoniumsulfat- und danach nochmals eine Aceton-Fällung durchgeführt. Insgesamt konnte das Enzym dadurch etwa 30-fach angereichert werden, wobei die spezifischen Aktivitäten nach der letzten Acetonfällung etwa 32 U/mg betrugen. Der Enzymverlust in diesen Reinigungsschritten betrug ca. 58%. Eine weitere Anreicherung mit Hilfe von Acetonfällungen wurde nicht versucht.

4.2. Anreicherung der Aminopeptidase II aus Bierhefe

Die Aminopeptidase II aus Bierhefe wurde zusammen mit der Dipeptidase aufgearbeitet.

Die ersten Reinigungsschritte (Autolyse, Ammoniumsulfat- und Hitze-Fällung, Gelfiltration an Sephadex G-150) erfolgten wie in 3.1.1. bis 3.1.4..

Die Aminopeptidase II tritt jedoch im Eluat von der Sephadex G-150-Säule nur dann auf, wenn die Autolyse nach 24 h beendet wurde. Nach 48- und 72-stündiger Autolyse kann kaum noch Aminopeptidase II nachgewiesen werden.

Nach der Gelfiltration erfolgt eine Chromatographie an DEAE-Cellulose. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, wird die Aminopeptidase II bei etwas niedrigeren NaCl-Konzentrationen von der Säule eluiert als die Dipeptidase.

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der AP II wurde diese wie die Aminopeptidase I mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle konzentriert. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration an Sepharose 6B, wobei Dextranblau, Katalase (MG 240 000 daltons), Hämoglobin und Tyrosinmethylester zur Eichung dienten. Wie man aus Abbildung 9 sehen kann, beträgt das Molekulargewicht der AP II etwa 200 000 daltons, was in guter Übereinstimmung zu einer kürzlich von MASUDA und Mitarbeitern (7) beschriebenen Aminopeptidase steht, die die Autoren Aminopeptidase I nannten.

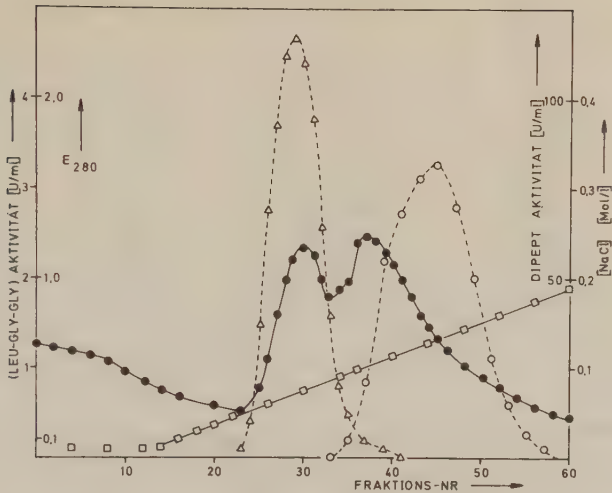


Abbildung 8: Chromatographie der Aminopeptidase II und der Dipeptidase (63) an DEAE-Cellulose (2 x 40 cm).

Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} .

Fraktionsvolumen: 5 ml

(●—●) E_{280} , (Δ — Δ) Aminopeptidaseaktivität, (○—○) Dipeptidaseaktivität (Substrat Gly-Leu) und (□—□) NaCl-Gradient.

Die AP II ist noch nicht bis zur Homogenität gereinigt, in der Disc-Elektrophorese zeigt das Enzym noch zwei starke Nebenbanden.

Zur weiteren Reinigung des Enzyms wurde eine präparative Disc-Elektrophorese versucht. Dabei wurde die AP II jedoch fast vollständig inaktiviert.

Die Aminopeptidase II weist nicht nur ein anderes Molekulargewicht auf als die AP I, sie zeigt auch eine ganz andere Substratspezifität (siehe Ergebnisse 4.10.)

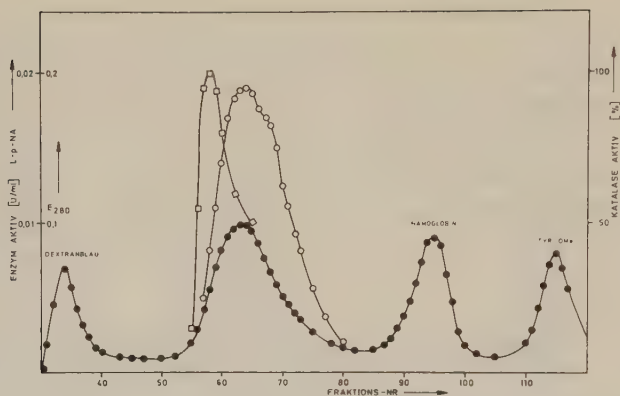


Abbildung 9 : Gelfiltration der Aminopeptidase II an Sepharose 6B (2 x 29 cm).

Puffer: 10 mM Tris/Succinat; pH 7,3; 0,1 mM Zn^{2+} .

Fraktionsvolumen: 0,75 ml

(●—●) E_{280} , (□—□) Katalase-Aktivität und (○—○) Aminopeptidaseaktivität.

TABELLE III: REINIGUNG DER AMINOPEPTIDASE I AUS BIERHEFE

Die Reinigung wurde wie in 3.1. beschrieben durchgeführt, ausgehend von 3 kg gepreßter Bierhefe. Die Aktivitäten wurden bei 40°C bei einer Substratkonzentration (Leu-Gly-Gly) von 30 mM unter Standardbedingungen (siehe 2.3.2.2.a) gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung
1 Autolysat (72 h)	131 000	109 000	0,83	100	1
2 Ammoniumsulfat-Fällung (50-70%)	43 000	75 000	1,75	69	2,1
3 Hitze-Fällung	31 500	72 000	2,3	66	2,8
4 Gelfiltration an Sephadex G-150	1 010	50 000	49,5	46	60
5 Aceton-Fällung (30% v/v)	820	46 000	56,4	42	68
6 Chromatographie an DEAE-Cellulose	200	39 000	199	37	240
7 Rechromatographie an DEAE-Cellulose	76	34 000	452	32	545
8 Gelfiltration an Sephadex 6B	30	23 000	765	21	920

TABELLE IV: REINIGUNG DER AMINOPEPTIDASE I NACH GRASSMANN ET AL. (Modifiziert)

Die Reinigung wurde wie in 3.2. beschrieben durchgeführt, ausgehend von 3 kg gepreßter Bierhefe. Die Aktivitäten wurden bei 40°C bei einer Substratkonzentration (Leu-Gly-Gly) von 30 mM unter Standardbedingungen (siehe 2.3.2.2. a) gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung
1 Autolysat mit Papain (48 h)	106 000	176 000	1,3	100	1
2 Essigsäure- Fällung	7 020	125 000	17,9	72	14
3 Natriumacetat- Fällung	2 280	99 000	48,3	56	37
4 Aceton-Fällung	250	85 000	340	48	260
5 Chromatographie an DEAE-Cellulose	69	44 160	642	25	494
6 Gelfiltration an Sephadex G-200	45	39 000	868	22	668

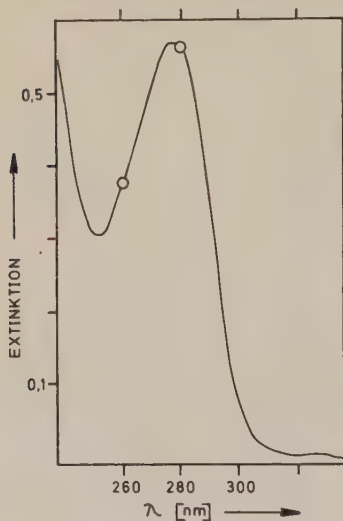
TABELLE V: REINIGUNG DER AMINOPEPTIDASE I NACH JOHNSON

Die Reinigung wurde wie in 3.3. beschrieben durchgeführt, ausgehend von 3 kg gepreßter Bierhefe. Die Aktivitäten wurden bei 40°C bei einer Substratkonzentration (Leu-Gly-Gly) von 30 mM unter Standardbedingungen (siehe 2.3.2.2.a) gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung
1 Autolyse (72 h)	96 300	125 000	1,3	100	1
2 Acetonfällung	22 980	90 000	3,8	72	2,9
3 Ammoniumsulfat- Fällung (50-70%)	11 400	60 700	5,3	49	4,1
4 Acetonfällung	1 650	52 800	32	42	24,6

4.3. Extinktionskoeffizient der AP I

Die Absorption einer 0,1%-igen Enzymlösung (hochgereinigte AP I, erhalten durch Gelfiltration an Sepharose 6B) beträgt



0,85 bei 280 nm bei einem A_{280}/A_{260} -Verhältnis von 1,7.

In guter Übereinstimmung dazu steht der aus dem Tryptophan- und Tyrosingehalt der Amino-peptidase I für $A_{280}^{0,1\%}$ abgeschätzte Wert von 0,7.

Abbildung 10: Spektrum der Amino-peptidase I (240-340 nm), Enzym in 20 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5.

$E_{280} = 0,57$, $E_{260} = 0,34$.

4.4. Reinheitskriterien

Wie man der Abbildung 4 entnehmen kann, stimmen Protein- und Aktivitätsverlauf (gemessen mit Leu-Gly-Gly und Leu-p-NA) bei der Rechromatographie der AP I an DEAE-Cellulose vollkommen überein. Die gleiche Abbildung macht allerdings auch einen Polymorphismus des Enzyms deutlich. Wie zu erwarten, tritt dieser auch auf, wenn man mit an DEAE-Cellulose rechromatographiertem Enzym Disc-Elektrophoresen durchführt (siehe Abb. 29). Wird das gleiche Enzym vor der Elektrophorese einer Acetonfällung unterworfen, so zeigt es jedoch nur eine Hauptproteinbande, deren elektrophoretische Beweglichkeit mit derjenigen der Bande übereinstimmt, die gegen Leu- β -Naphthylamid aktiv ist (Abb. 11).

Neben dieser Hauptbande treten noch mehrere Nebenbanden auf, die auf die inaktiven Untereinheiten des Enzyms zurückzu-

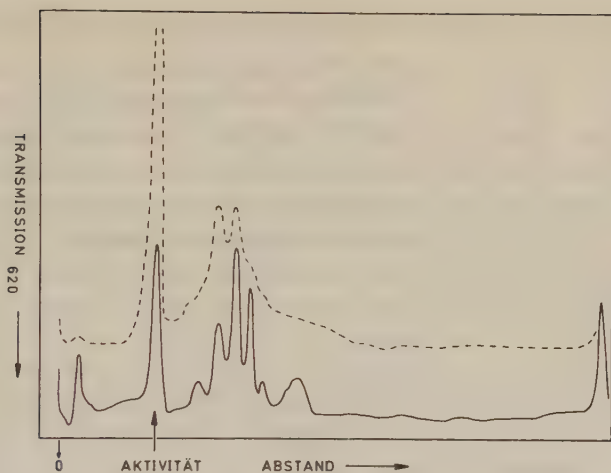


Abbildung 11: Disc-Elektrophorese von an DEAE-Cellulose rechromatographierter Amino-peptidase I, die vor erfolgter Elektrophorese mit Aceton gefällt (gestrichelte Linie), oder gefriergetrocknet wurde (durchgezogene Linie). Zur Durchführung der Elektrophoresen siehe Methoden.

führen sind (siehe 4.8.).

Führt man vor der Elektrophorese statt der Acetonfällung eine Gefrier Trocknung durch, so erhält man ebenfalls Banden an den gleichen Stellen, jedoch ist die Intensitätsverteilung wesentlich verschieden (siehe Abb.11): Die Intensität der Bande, die gegen Leu- β -Naphthylamid aktiv ist, ist im Vergleich zu den anderen Banden sehr viel kleiner als im Falle von acetongefällter Amino-peptidase I.

Bei der SDS-Elektrophorese erhält man jedoch in den meisten Fällen eine einzige Hauptbande (Peak II), deren Molekulargewicht $51\,000 \pm 2\,000$ daltons entspricht (siehe Abb.12, 13). Daneben treten noch drei weitere kleine Peaks auf, von denen dem-einen ein Molekulargewicht von $100\,000$ daltons (Peak I), den beiden anderen Molekulargewichte von $38\,000 \pm 3\,000$ (Peak III) und $26\,000 \pm 3\,000$ (Peak IV) zuzuordnen sind.

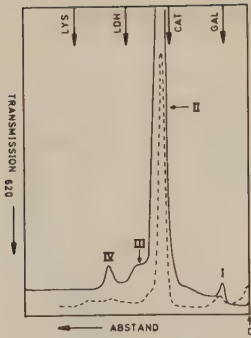


Abbildung 12: SDS - Elektrophorese der Aminopeptidase I.
Ausführung und Aufnahme der Densitogramme: Siehe Methoden.

Durchgezogene Linie: SDS-Elektrophorese von an DEAE-Cellulose rechromatographiertem Enzym.
Gestrichelte Linie: Gleiches Enzym nach Perameisensäureoxidation.

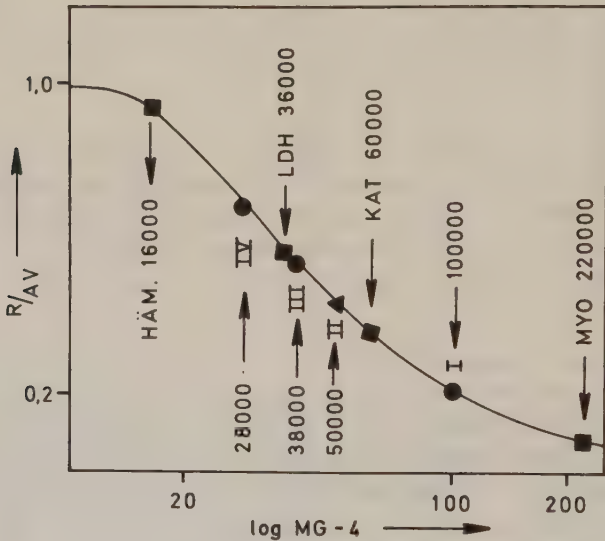


Abbildung 13: SDS - Elektrophorese der AP I.
Aufgetragen sind die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten in Abhängigkeit vom Molekulargewicht zur Bestimmung der Molekulargewichte der bei der SDS-Elektrophorese der AP I erhaltenen Proteinbanden.
Als Eichproteine dienen Myosin (Myo), Katalase (Kat), Lactatdehydrogenase (LDH) und Hämoglobin (Häm).

4.5. Aminosäurezusammensetzung des Enzyms

Die Aminosäurezusammensetzung der Aminopeptidase I ist in Tabelle VI wiedergegeben.

Zur Aminosäurebestimmung wurden einmal die gesammelten aktiven Fraktionen von der Rechromatographie an DEAE-Cellulose (Abb.4) und zum anderen die gesammelten aktiven Fraktionen nach abschließender Gelfiltration an Sephadex G-200 einer nach GRASSMANN (16) durchgeführten Enzympräparation (Abb.7) verwendet.

Aus den Werten der Tabelle VI berechnet sich für das Enzym unter der Annahme, daß eine Proteinkette ein Tryptophan enthält, ein minimales Molekulargewicht von 22 000 daltons. Verdoppelt man diesen Wert und berücksichtigt, daß das Enzym 12 Gewichtsprozente Zucker enthält (siehe unten), so erhält man ein Molekulargewicht von 50 000 daltons (Proteinanteil $88\% = 44\ 000\ \text{daltons} \times 100/88 = 50\ 000\ \text{daltons}$).

Dieser Wert steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem bei der SDS-Elektrophorese gefundenem Molekulargewicht.

Da bei Phenylalanin zwischen verschiedenen Experimenten die geringsten Abweichungen gefunden wurden, sind die besten ganzzahligen Vielfachen der einzelnen Aminosäuren in Tabelle VI auf 22 Phenylalanine/Untereinheit bezogen.

4.6. Zuckergehalt der AP I

Behandelt man die bei der Disc-Elektrophorese erhaltenen Gele mit Perjodsäure und SCHIFFS Reagenz (siehe Methoden), so wird ersichtlich, daß die Aminopeptidase I ein Glykoprotein ist. Die so erhaltenen Kohlenhydratbanden weisen die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit auf wie die Proteinbanden.

Der gesamte Kohlenhydratanteil des Enzyms wurde nach 2.3.11. bestimmt. Die bei den Bestimmungen erhaltenen Eichkurven und Meßwerte sind in den Abbildungen 14 a und b zu sehen. Unter Berücksichtigung des Proteinanteils des Enzyms, der mit der gleichen Enzymprobe aus der Aminosäureanalyse bestimmt wurde, und den aus den Eichkurven erhaltenen Meßwerten, kann man den

TABELLE VI: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER AMINOPEPTIDASE I

Falls nicht anders angegeben, basieren die angeführten Werte auf 5-6-maligen Bestimmungen. Die Beträge der einzelnen Aminosäuren und ihre Standardabweichungen sind in Prozent der Summe aller Aminosäurereste ausgedrückt (g/100 g Protein). Die Anzahl der Reste pro Untereinheit sind auf 22,0 - Reste Phenylalanin pro Kette bezogen.

Aminosäure	g/100 g Protein ± S.A.	Anzahl d. Reste pro 22 Phe [±] S.A.	bestes ganz- zahl.Vielf.
Asparaginsäure	11,57 ± 0,58	45,1 ± 2,2	45
Threonin	5,11 ± 0,09	22,7 ± 0,4	23
Serin a)	5,61 ± 0,16	28,9 ± 0,8	29
Glutaminsäure	10,24 ± 0,25	35,6 ± 0,6	36
Prolin a)	4,46 ± 0,22	20,6 ± 1,0	21
Glycin	4,82 ± 0,09	37,9 ± 0,7	38
Alanin	4,45 ± 0,08	28,1 ± 0,5	28
Cystein b)	1,16 ± 0,08	3,9 ± 0,3	4
Valin	5,55 ± 0,35	25,1 ± 1,5	25
Methionin b)	1,52 ± 0,3	5,2 ± 0,8	5 (6)
Isoleucin	5,96 ± 0,20	20,4 ± 0,8	21 (20)
Leucin	9,84 ± 0,24	39,0 ± 0,9	39
Tyrosin	5,46 ± 0,54	15,0 ± 1,4	15
Phenylalanin	7,22 ± 0,07	- 22,0 -	22
Histidin	3,39 ± 0,07	11,1 ± 0,3	11
Lysin	7,69 ± 0,10	27,3 ± 0,3	27
Arginin	5,08 ± 0,07	14,6 ± 0,2	15
Tryptophan c)	0,87 ± 0,08	2,1 ± 0,2	2
Summe	100,00		406

Molekulargewicht (ohne Berücksichtigung d.Zuckers): 44 800

a) extrapoliert auf Hydrolysezeit null

b) 2 Bestimmungen, nach Ameisensäureoxidation

c) 3 Bestimmungen, Hydrolyse in Gegenwart von 5% Thioglykolsäure, Werte nicht korrigiert

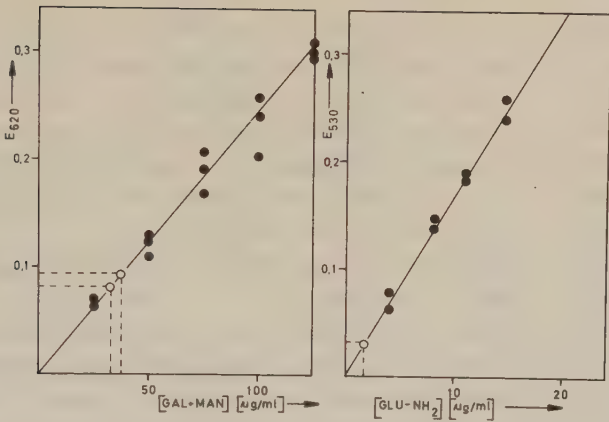


Abbildung 14 a und b: Bestimmung des Zuckergehaltes der AP I (Neutralzucker und Hexosamine).

Zur Ausführung siehe Methoden.

Wert für Hexosen: 33 und 38 $\mu g/ml$

Wert für Hexosamine: 1,8 und 1,8 $\mu g/ml$

Summe aller Aminosäuren: 265 μg

gesamten Kohlenhydratanteil des Enzyms berechnen. Er beträgt etwa 12 Gewichtsprozente und setzt sich zu ca. 95% aus neutralen Hexosen zusammen, wobei nachgewiesen werden konnte, daß das Enzym keine Glucose enthält.

Bisher wurden noch keine weiteren Versuche unternommen, zu erfahren, welche Hexosen an das Protein gebunden sind.

Für die Bestimmung der Neutralzucker wurden Eichkurven mit Galaktose und Mannose im Verhältnis 1:1 aufgestellt. Da die Farbausbeute bei der Anthron-Reaktion stark von der verwendeten Hexose abhängig ist, ist der oben angegebene Wert nur ein Näherungswert.

Das Enzym enthält nur einen geringen Anteil Hexosamine (5%, bezogen auf den Gesamtzuckergehalt) und keine Neuraminsäure.

4.7. Zink - Gehalt der AP I

Zur Bestimmung des Zink-Gehaltes des Enzyms wurden die unter Methoden (2.3.10.) beschriebenen Enzymlösungen verwendet. Sowohl die 1 Woche gegen Ammoniumacetatpuffer dialysierte Enzymprobe als auch das mit EDTA-behandelte Enzym enthielten unter Berücksichtigung des Zinkgehaltes der Puffer $0,02 \pm 0,005$ Gewichtsprozente Zink. Dies entspricht einem Gehalt von $1,8 \pm 0,5$ Mol Zink pro 600 000 g Enzym.

Gleichzeitig wurde auch der Zink-Gehalt des Dialysepuffers bestimmt. Er betrug $0,04 \mu\text{M}$.

Sowohl bei der Dialyse als auch bei der EDTA-Behandlung des Enzyms konnte keine irreversible Denaturierung festgestellt werden; unmittelbar nach dem Zusatz von Zn^{2+} und Cl^- zeigte das wie oben behandelte Enzym normale spezifische Aktivitäten.

Ein höherer Zink-Gehalt (0,2-0,3%) wurde mit einer Enzymprobe erhalten, die in Gegenwart von Zn^{2+} (siehe 3.1.) gereinigt und ebenfalls 1 Woche gegen den obigen Puffer dialysiert worden war.

4.8. Molekulargewicht und Untereinheiten

4.8.1. Dichtegradientenzentrifugationen

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes des aktiven Enzyms und der Sedimentationskonstanten der Untereinheiten wurden Dichtegradientenzentrifugationen immer mit der gleichen nach 2.3.3. mit EDTA behandelten Aminopeptidase I durchgeführt, die in 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5, in konzentrierter Form vorlag. Verdünnt man diese Enzymlösung mit Puffern verschiedener pH-Werte und führt dann unter den gleichen äußeren Bedingungen die Dichtegradientenzentrifugationen in den Puffern mit den entsprechenden pH-Werten durch, so erkennt man, daß die Verteilung der Untereinheiten des Enzyms pH-abhängig ist. Aus der Abbildung 15 wird dies ersichtlich.

Unter den gleichen Bedingungen wurden auch Eichproteine, deren

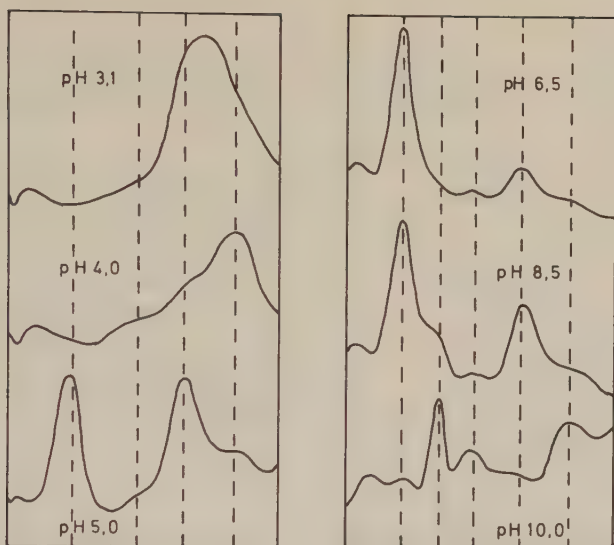


Abbildung 15: Dichtegradientenzentrifugationen der AP I bei verschiedenen pH-Werten.

EDTA-behandeltes Enzym (siehe 2.3.3.) wurde konzentriert. 50 μ l (ca. 6mg/ml) in 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5, wurden mit 50 μ l 0,2 M Puffer verdünnt. Folgende Puffer wurden verwendet:

pH 3,1, 4,0 und 5,0 Na-Acetatpuffer,

pH 8,5 und 10,0 Na-Boratpuffer und pH 6,5 Phosphatpuffer.

Die Dichtegradientenzentrifugationen erfolgten nach einer Inkubation von 4 h in den obigen Puffern bei Raumtemperatur. Zur Durchführung der Versuche siehe auch Methoden.

Zentrifugationsdauer: 17 h bei 35 000 rpm.

Sedimentationskonstanten und Molekulargewichte bekannt sind, der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Dadurch konnte eine Eichkurve erstellt und die Sedimentationskonstanten der Untereinheiten der Amino-peptidase I graphisch ermittelt werden. Wie sich der Abbildung 16 entnehmen läßt, ergeben sich die folgenden Sedimentationskonstanten: 20 S und 16,5 S

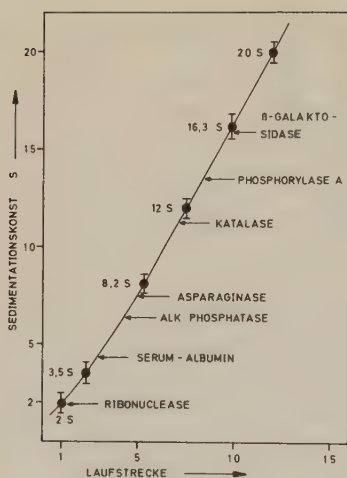


Abbildung 16: Eichkurve zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten von aktivem Enzym und der Untereinheiten der AP I.

Zur Herkunft der Eichproteine siehe Material. Ihre Sedimentationskonstanten sind durch

← gekennzeichnet.

Die Sed.-Konst. des Enzyms sind durch ● (Mittelwerte), die Abweichungen durch I gekennzeichnet.

für das aktive Enzym, 12,0 S, 8,2 S, 3,5 S und ca. 2 S für die Untereinheiten.

Die Untereinheit mit 2 S findet man vorwiegend bei niedrigem pH. Der den 16,5 S entsprechende ebenfalls aktive Proteinpeak tritt augenscheinlich nur im alkalischen Bereich bei pH 8,5 und 10,0 auf, während alle anderen Peaks bei allen pH-Werten zu finden sind.

Für die aktive Form des Enzyms mit einer Sedimentationskonstante von 20 S (siehe Abbildung 17 a) berechnet sich mit der von JOHNSON angegebenen Diffusionskonstante von $3,09 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ und dem von uns aus der Aminosäureanalyse und der Zuckerbestimmung des Enzyms ermittelten partiellen spezifischen Volumen (175,176), von $0,735 \text{ cm}^3/\text{g}$ nach der Svedberg - Gleichung ein Molekulargewicht von ca. 595 000 daltons.

SVEDBERG-Gleichung:
$$M = \frac{S \cdot R \cdot T}{D (1 - \tilde{v} \rho)}$$

S = Sedimentationskonstante, R = Gaskonstante

D = Diffusionskonstante, ρ = Dichte des Lösungsmittels

T = Temperatur in Grad Kelvin

$\bar{v}$ = partielles spezifisches Volumen.

$$M = \frac{20,0 \times 10^{-13} \text{ sec} \times 8,314 \text{ Joule grad}^{-1} \text{ Mol}^{-1} \times 293 \text{ grad}}{3,09 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} (1 - 0,735 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \times 1 \text{ g cm}^{-3})}$$

$$M = \frac{20,0 \times 10^{-6} \times 8,314 \times 293}{3,09 (1 - 0,735)} \times 10^7 \text{ g Mol}^{-1}$$

$$M = 595 \text{ 000 g Mol}^{-1}$$

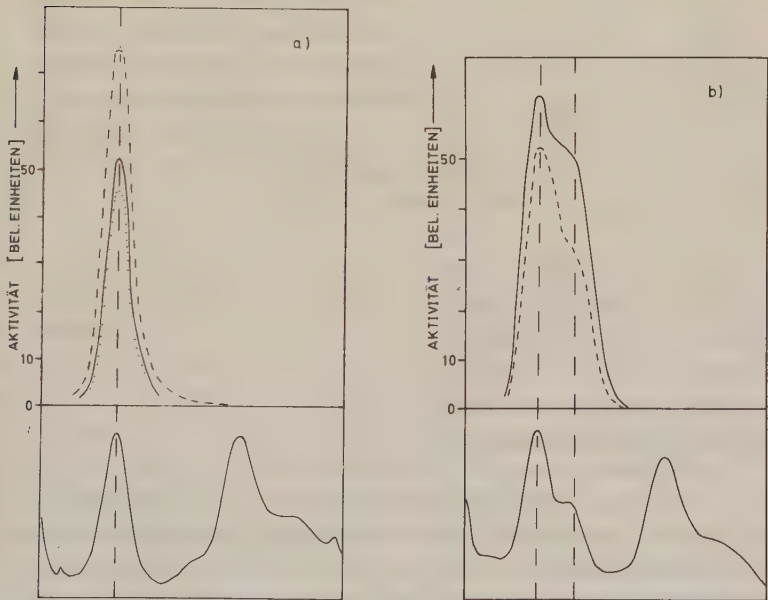


Abbildung 17 a und b: Dichtegradientenzentrifugation bei pH 5,0 (a) und 8,5 (b). Im oberen Teil der Bilder sind die Aktivitäten, im unteren ist der Proteinverlauf dargestellt. Aktivitäten in a: (- -) sofortige Aktivitätsmessung, nach 1 Tag (—) und nach 4 Tagen (* * * * *). Aktivitäten in b: (—) sofortige Aktivitätsmessung und nach 1 Tag (- -).

Wie sich der Abbildung 17 auch entnehmen läßt, nehmen die Aktivitäten der durch Dichtegradientenzentrifugation bei pH 5,0 und 8,5 erhaltenen Peaks beim Stehenlassen bei 4°C deutlich ab. Dies ist nicht auf eine Denaturierung des Enzyms, sondern auf die Umwandlung von aktivem Enzym in die inaktiven Untereinheiten zurückzuführen, wie die bei pH 8,5 durchgeführten Dichtegradientenzentrifugationen beweisen, bei denen EDTA-behandeltes Enzym unterschiedlich lange im Puffer vor der Durchführung der Zentrifugationen vorinkubiert wurde (Abb.18).

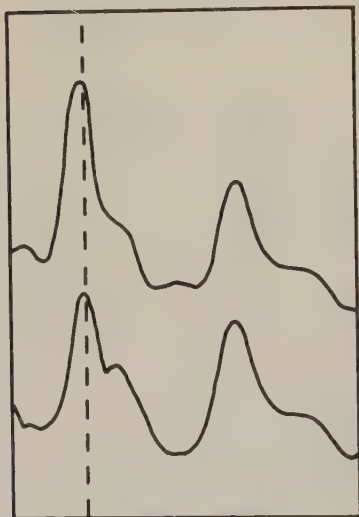


Abbildung 18: Proteinverlauf bei der Dichtegradientenzentrifugation bei pH 8,5 nach unterschiedlicher Vorinkubation bei Zimmertemperatur.

4 h unterer, 20 h oberer Kurvenverlauf.

Sammelt man die aktivsten Fraktionen der durch Dichtegradientenzentrifugationen bei verschiedenen pH-Werten erhaltenen aktiven Peaks und mißt die Aktivitäten sofort nach erfolgter Zentrifugation und dann in verschiedenen Zeitabständen, so erkennt man (Abb. 19), daß die Aktivitätsabnahme bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich ist. Nach geraumer Zeit kommt die Aktivitätsabnahme zum Stillstand, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß die Gleichgewichtslage zwischen den einzelnen Untereinheiten wieder erreicht ist. Weitere Versuche zur Dauer der Gleichgewichtseinstellungen wurden unter "Enzymstabilität" durchgeführt.

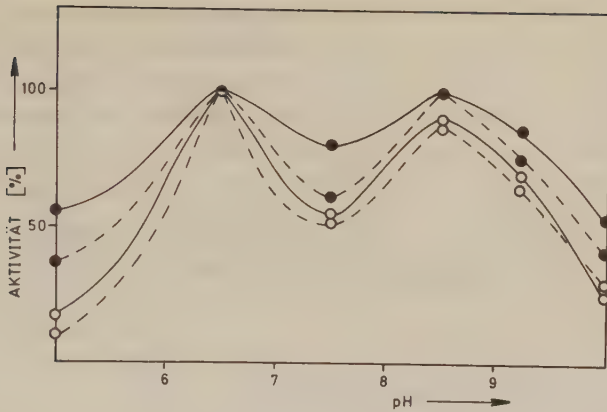


Abbildung 19: Relative Enzymaktivitäten der jeweils aktivsten Fraktionen nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation bei verschiedenen pH-Werten.

Aktivitätsmessung sofort (●—●), nach 20 h (●--●), nach 2 Wochen (○—○) und nach 3 Wochen (○--○).

Wie bereits erwähnt, benötigt die Aminopeptidase I aus Hefe zur vollen Aktivitätsentfaltung Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- . Die Aktivierung des Enzyms durch diese Ionen beruht aber nicht auf der Umwandlung von inaktiven Untereinheiten in aktives Enzym. Dies zeigt deutlich der Versuch, bei dem EDTA-behandeltes Enzym auf pH 7,8 gebracht wurde, wobei einmal keine Aktivatoren und zum anderen Zink und Chlorid hinzugefügt wurden (Abb. 20). Die Verteilung der Untereinheiten ist unter diesen Bedingungen in beiden Fällen gleich.

Der Einfluß von Guanidin-Hydrochlorid auf die Verteilung der Untereinheiten wird in Abbildung 21 dargestellt, die das Ergebnis einer Dichtegradientenzentrifugation bei pH 7,8 in 1 M Gua x HCl wiedergibt. Wie man sieht, (vergleiche dazu Abb. 20), ist das Enzym unter diesen Bedingungen vollständig in inaktive Untereinheiten zerlegt, wobei die mit einer Sedimentationskonstante von 2 S bei weitem überwiegt. Daneben ist noch eine kleine Bande mit 3,5 S zu beobachten. Peptidaseak-

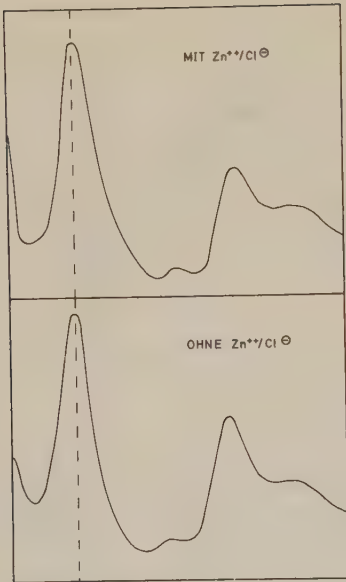
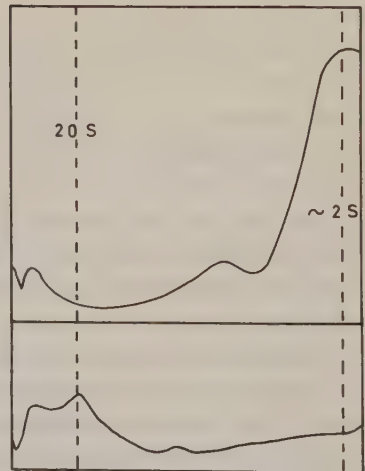


Abbildung 20: Dichtegradienten-zentrifugation bei pH 7,8 (Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer) mit und ohne die Aktivatoren Zn^{2+} und Cl^- .

Vorinkubation im Puffer: 4 h bei Raumtemperatur.

Aktivatorkonzentrationen: 0,1 mM Zn^{2+} , 100 mM Cl^- .

Abbildung 21: Dichtegradienten-zentrifugation der AP I bei pH 7,8 in 1 M Gua x HCl nach 4 h Vorinkubation bei Raumtemperatur (Bildoberteil) und nach 1-wöchiger Dialyse des Peaks mit 2S gegen Kolthoff-Puffer (pH 7,8; 0,1M NaCl; 0,1 mM Zn^{2+}) und Einengen (unterer Teil des Bildes, zu beachten ist hier die kleinere Enzymkonzentration im Gradienten).



tivität ist nicht mehr festzustellen.

Sammelt man die obige Proteinbande mit 2S, dialysiert gegen Puffer, engt mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle ein und führt mit diesem Material nochmals eine Dichtegradientenzentrifugation durch, so reaggregiert das durch $\text{Gua} \times \text{HCl}$ inaktivierte Enzym zur 600 000 - Form (Abb. 21).

Auch durch Harnstoff wird das Enzym in seine Untereinheiten zerlegt wie die Abbildung 22 deutlich macht.

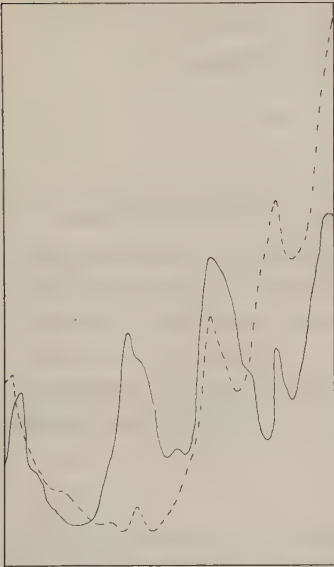


Abbildung 22: Dichtegradientenzentrifugation bei pH 8,5
(0,2 M BoratPuffer)

Proteinverlauf bei 0 M ()
und bei 4 M () Harnstoff.
Vorinkubation: 1 h bei 40°C.
Verwendet wurde FITC-Enzym
(AP I wurde mit trägergebundenem
Fluoresceinisothiocyanat
2 h bei Raumtemperatur bei pH
8,5 gerührt, überschüssiges
Reagenz mit Hilfe einer Sephadex
G-25-Säule entfernt).

Kuppelt man die Aminopeptidase in Gegenwart von SDS mit Fluoresceinisothiocyanat, so liegt das Enzym im Dichtegradienten auch nach Entfernung von überschüssigem SDS und FITC in den inaktiven Formen mit Sedimentationskonstanten von 3,5 und 2 S vor neben einem geringen Anteil an höhermolekularen Aggregaten. Die aktive Form fehlt auch hier fast ganz. (siehe Abb. 23).

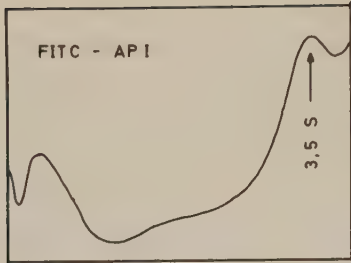


Abbildung 23: Dichtegradientenzentrifugation von FITC-Enzym bei pH 8,5.

AP I wurde mit trägergebundenem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bei pH 9 in 0,1 M Carbonatpuffer in Gegenwart von 1% SDS 1 h lang gerührt und überschüssiges FITC und SDS dann mit Hilfe einer Sephadex G 25-Säule entfernt. Das Enzym wurde konzentriert

und in 0,2 M Boratpuffer, pH 8,5, 4 h vorinkubiert.

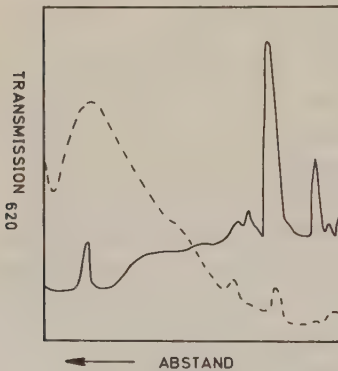


Abbildung 24: Disc-Elektrophorese der AP I vor (—) und nach (---) der Reaktion mit Fluoresceinisothiocyanat. Verwendet wurde ein 5%-iges Gel.

Zur Ausführung und Aufnahme der Densitogramme siehe Methoden.

Ein Vergleich der Proteinverteilung wird in Abbildung 24 gezeigt, in der Disc-Elektrophoresen der AP I vor und nach der Reaktion mit FITC dargestellt sind.

Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man das Enzym mit Bernsteinsäureanhydrid succinyliert. Auch hier liegt das Enzym größtenteils in der Form seiner kleinsten Untereinheit vor, jedoch treten auch die anderen möglichen Formen auf (Abb. 25). Bei der Succinylierung der AP I (Bernsteinsäureanhydrid reagiert mit Aminogruppen des Enzyms) werden zahlreiche negative Ladungen in das Enzym durch den Bernsteinsäurerest eingeführt, die sich abstoßen und dadurch einen

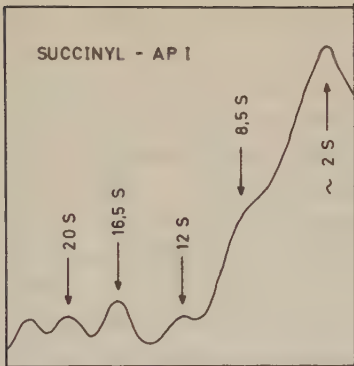


Abbildung 25: Dichtegradientenzentrifugation von succinylierter AP I bei pH 8,5 (0,2 M Boratpuffer)

AP I wurde über Nacht bei 4°C mit 10 mM Bernsteinsäureanhydrid vorinkubiert.

Zerfall des Enzyms bewirken.

4.8.2. Gelfiltration an Sepharose 6B und Dichtegradienten

Wie bereits erwähnt, läßt sich die spezifische Aktivität von an DEAE-Cellulose rechromatographiertem Enzym durch eine nachfolgende Gelfiltration an Sepharose 6B noch erhöhen (siehe 3.1.). Hierbei wird das aktive Enzym von inaktiven Untereinheiten und höhermolekularen Aggregaten getrennt (Abb. 26 a). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Dichtegradientenzentrifugationen findet man neben der aktiven Form mehrere Untereinheiten mit kleineren Molekulargewichten. Außerdem treten noch höhermolekulare Aggregate auf, die mit dem Ausschlußvolumen der Säule erscheinen und ebenfalls inaktiv sind. Wie die Abbildung 26 a auch zeigt, stimmen Protein- und Aktivitätsverlauf nicht miteinander überein, was auf eine Überlagerung des Proteinpeaks mit dem Molekulargewicht von 600 000 daltons (aktiv) und einer niedermolekularen Untereinheit (inaktiv) zurückzuführen ist.

Engt man die bei der ersten Gelfiltration an Sepharose 6B erhaltenen Fraktionen 31-44 ein und führt mit der gleichen Säule unter den gleichen Bedingungen nochmals eine Gelfiltration durch, so stimmen diesmal Protein und Aktivität miteinander überein. (Abb. 26 b). Wie die Figur b ebenfalls

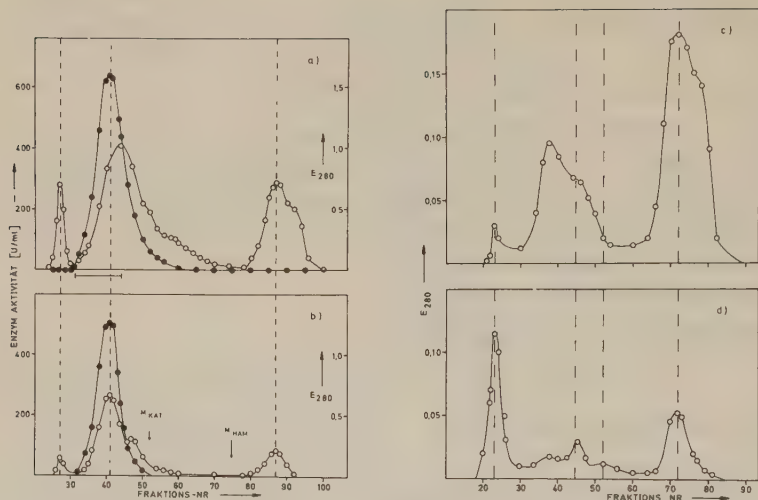


Abbildung 26: Gelfiltration an Sepharose 6B (2 x 45 cm) in Lauf a und b, (2 x 28 cm) in Lauf c und d.

Puffer: 50 mM Ammoniumacetat, pH 6,5.

Lauf a: An DEAE-Cellulose rechromatographierte AP I.

Lauf b: Gesammelte Fraktionen 31-44 von Lauf a.

Lauf c: Gesammelte Fraktionen 77-100 von Lauf a.

Lauf d: Gesammelte Fraktionen 22-30 von Lauf a.

zeigt, treten bei der wiederholten Gelfiltration der aktiven Form des Enzyms auch wieder die bereits bei der ersten Chromatographie erschienenen Proteinpeaks, die den Formen des Enzyms mit kleineren und höheren Molekulargewichten (als 600 000 daltons) entsprechen auf. Unter den Versuchsbedingungen liefert das aktive Enzym also auch wieder die anderen inaktiven Formen.

Interessant war die Frage, ob aus den inaktiven Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 64 000 daltons (MG Hämoglobin) und aus den höhermolekularen Formen wieder aktives Enzym gebildet werden kann. Um dies beantworten zu

können, wurden die Fraktionen 77-100 sowie die Fraktionen 22-30 aus dem Lauf a wiederum mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle konzentriert und nochmals an einer Sepharose 6B-Säule einer Gelfiltration unterworfen, wobei die durch Konzentrierung der Fraktionen 22-30 erhaltene Enzymprobe zuvor 48 h mit Substrat (5 mM Ala-Thr-Ala-OMe) inkubiert wurde. Wegen der geringeren Proteinkonzentrationen wurden diese Gelfiltrationen mit einer kleineren Säule durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 26 c und d zu sehen. Die Gelfiltration der konzentrierten niedermolekularen Untereinheit und der eingeengten höheren Aggregate ergeben das gleiche Bild wie man es bei der Gelfiltration der an DEAE-Cellulose rechromatographierten AP I erhielt (Lauf a).

Allerdings ist die Verteilung der Untereinheiten anders: Aus der inaktiven Form mit einem Molekulargewicht 64 000 daltons ist aktives Enzym entstanden. Auch die hochmolekularen Aggregate treten, wenn auch in sehr geringen Mengen, neben der Form mit einem Molekulargewicht von 240 000 daltons (M_{Kat}), die als Schulter des 600 000 daltons-Peaks zu sehen ist, wieder auf.

Diese höhermolekularen Aggregate ergeben bei der Rechromatographie die aktive Form neben der 300 000- und der 50 000-Untereinheit. Außerdem ist ein ausgeprägter Peak mit einem Maximum bei Fraktionsnummer 52 (Abb. 26 d) zu sehen, der in den Abbildungen a und b der obigen Serie nur als Schulter zu erkennen ist. Bei der Gelfiltration der kleinsten Untereinheit tritt dieser Peak nicht auf.

Auch die Fraktionen 77-100 aus dem Sepharose-Lauf a wurden wie oben beschrieben eingeengt und dann wie die anderen eingeengten Enzymproben (22-30 und 31-44) ohne weitere Behandlung der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 27 a-c zu sehen.

Wie man sieht, entsteht aus dem höhermolekularen Enzymaggregat nur wenig aktives Enzym (Figur a), während aus dem aktiven Enzym (gesammelte Fraktionen 31-44, Lauf a) auch nur wenig inaktive Untereinheiten entstehen (Figur c). Die Dichtegradientenzentrifugation der Fraktionen 77-100 (Figur b)

zeigt, daß aus den kleinsten Untereinheiten des Enzyms doch in größerem Maße wieder aktives Enzym entstanden ist.

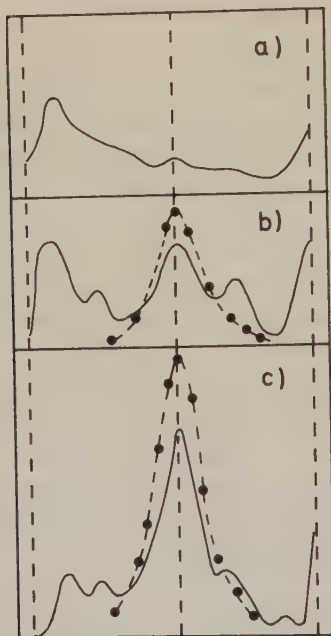


Abbildung 27: Dichtegradientenzentrifugation der einzelnen gesammelten und eingengten Peaks bei pH 6,5 (0,2 M Ammoniumacetatpuffer) nach Gel-filtration an Sepharose 6B (siehe Abb. 26 a).

a) gesammelte Fraktionen
20 - 30

b) gesammelte Fraktionen
77 - 100

c) gesammelte Fraktionen
31 - 44

Um zu sehen, ob ein oder mehrere höhermolekulare Aggregate vorliegen, wurde wiederum eine Dichtegradientenzentrifugation bei pH 6,5 durchgeführt, der die gesammelten Fraktionen der Sepharose 6B - Säule unterworfen wurden, die mit dem Ausschlußvolumen der Säule erscheinen. Zum Vergleich wurde unter den gleichen Bedingungen auch aktives Enzym der gleichen Präparation untersucht. Wie man in Abbildung 28 sieht, ist zunächst aus dem höhermolekularen Protein wieder aktives Enzym entstanden. Es ist auch erkennbar, daß mehrere höhermolekulare Aggregate vorliegen, da der dazugehörige Peak nicht einheitlich ist, sondern wenigstens drei Schultern aufweist. Auch das aktive Enzym ist zum Teil wieder reaggregiert

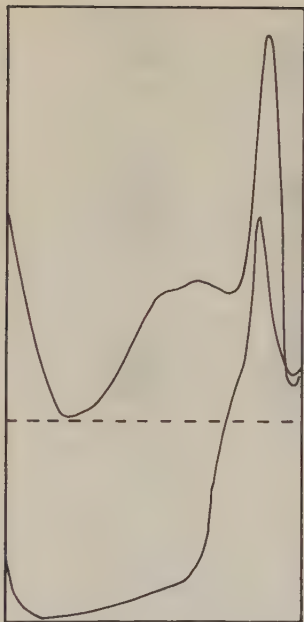


Abbildung 28: Dichtegradienten-
zentrifugation von aktivem En-
zym (unteres Bild) und von
höhermolekularen Aggregaten
(oberes Bild) bei pH 6,5
(0,2 M Ammoniumacetatpuffer)
Zentrifugationsdauer: 4 h bei
35 000 rpm.

4.8.3. Polymorphismus des Enzyms bei der Rechromatographie an DEAE - Cellulose

Wie bereits erwähnt, zeigt die AP I bei der Rechromatographie an DEAE-Cellulose einen ausgeprägten Polymorphismus (siehe Abbildung 4), der schon auf das Auftreten von Untereinheiten hinweist. Von dem Eluat der DEAE-Cellulose wurden verschiedene Fraktionen einer Disc-Elektrophorese unterzogen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt.

Die hier zu sehenden Banden treten natürlich auch bei der Elektrophorese der gesammelten Fraktionen auf (siehe Abb.11). Eine Erklärung für die meist in geringerer Intensität auftretenden Nebenbanden, die auch bei der isoelektrischen Fokkusierung (siehe unten) zu finden sind, bietet zum Beispiel

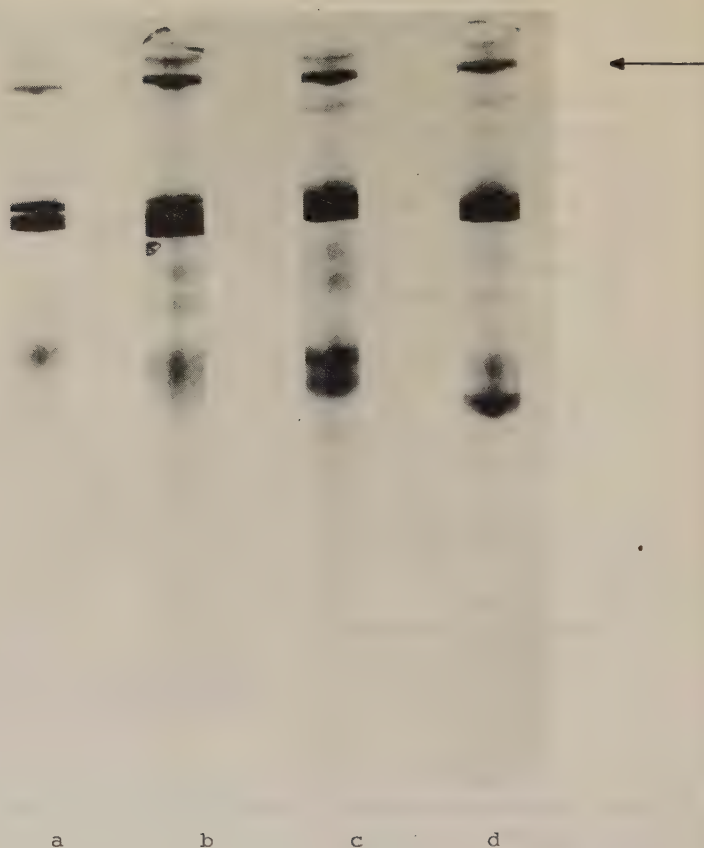


Abbildung 29: Disc-Elektrophorese verschiedener Fraktionen von an DEAE-Cellulose rechromatographierter AP I. Fraktionsnummern 50 (a), 60 (b), 70 (c) und 80 (d). Vergleiche hierzu Abbildung 4. Aktivität $\longrightarrow$. Zur Ausführung siehe Methoden.

die lange Autolyse der Hefe, bei der das Enzym zahlreichen Proteasen ausgesetzt ist, die vom Enzym mehr oder weniger große Peptidketten abspalten können. Weitere Möglichkeiten bestehen darin, daß nicht alle Enzymmoleküle den gleichen Zuckergehalt und den gleichen Amidgehalt aufweisen, was eben-

falls zu einer Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit führt.

Führt man mit den einzelnen Fraktionen des DEAE-Cellulose-Eluates Aminosäureanalysen durch, so stellt man fest, daß keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der sauren zu den basischen Aminosäuren auftreten.

Die Verteilung der Banden in Abbildung 29 entspricht nicht der, die man finden würde, könnte man die Disc-Elektrophoresen bei pH 7,3, bei dem die Rechromatographie erfolgt, durchführen. Aus technischen Gründen kann die Elektrophorese nur bei pH 8,9 durchgeführt werden. Eine Veränderung des pH hat aber eine neue Verteilung der Untereinheiten zur Folge, was durch die Dichtegradientenzentrifugationen bewiesen wurde.

4.8.4. Isoelektrische Fokkussierung des Enzyms

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der AP I wurde mit an DEAE-Cellulose rechromatographiertem Enzym eine isoelektrische Fokkussierung durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 30 zu sehen ist.

Auch hier zeigt das Enzym wieder einen Polymorphismus, für dessen Auftreten die schon eben erwähnten Gründe zu nennen sind. Das Maximum der Enzymaktivität findet man bei pH 4,7, was in guter Übereinstimmung steht zu den von GRASSMANN (16) und JOHNSON (1) berichteten Werten steht. Wie man auch sehen kann, ist der Hauptpeak nicht ganz symmetrisch. Er weist 2 kleine Schultern auf. Geringe Aktivitäten findet man auch bei den anderen pH-Werten in dem gemessenen Bereich des Gradienten.

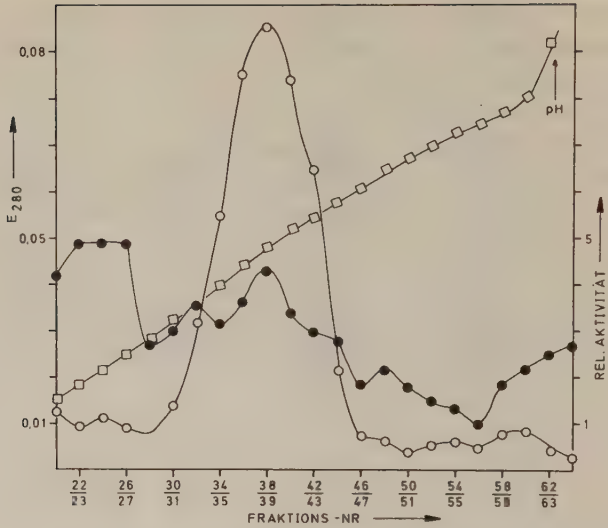


Abbildung 30: Isoelektrische Fokkussierung der AP I.

Zur Ausführung siehe Methoden. Gradient pH 4 - 6.

Die Messung der Proteinkonzentrationen und die Bestimmung der Aktivitäten (nach 2.3.2.2.a mit 10 mM Ala-Thr-Gly-OMe als Substrat) erfolgten nach 24-stündiger Dialyse gegen 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,5. Zuvor wurden die pH - Werte der einzelnen Fraktionen mit Hilfe einer Mikro-Elektrode (siehe Geräte) gemessen.

- E₂₈₀
- Aktivität
- pH-Gradient

4.8.1. Elektronenmikroskopische Aufnahme des Enzyms

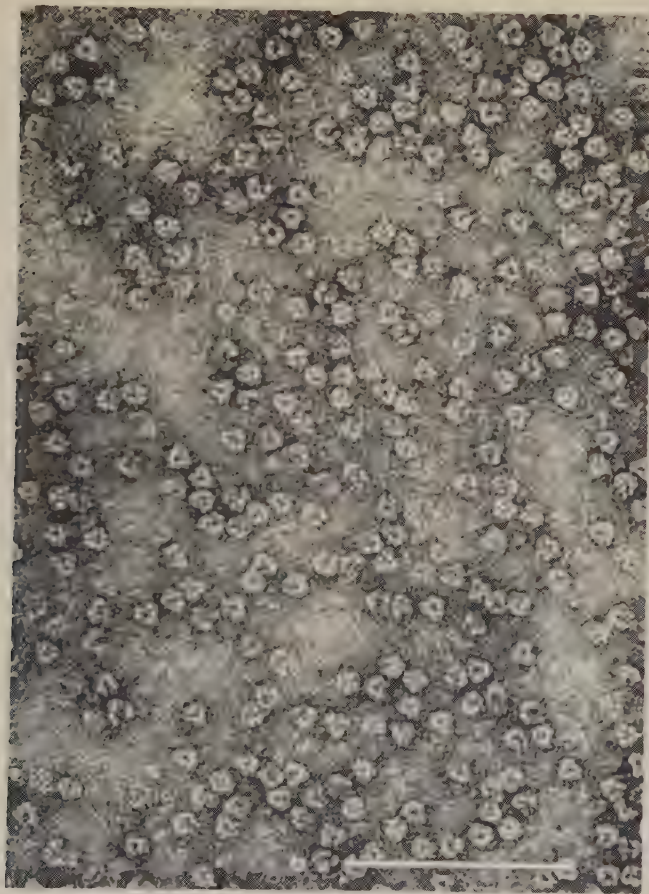


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme der AP I

Die Aufnahme wurde von Frau Dr. R. MARX (165) gemacht.

Methode: Negative Kontrastierung mit Uranyl-Formiat.

Die weiße Linie im Bild entspricht 1000 Angström.

Enzymkonzentration 1,5 mg/ml in 50 mM Ammoniumacetatpuffer
(pH 6,2; 0,1 M NaCl; 0,1 mM Zn^{2+}).

4.9. Stabilität des Enzyms

Im Vergleich zur Hefedipeptidase (63) ist die Aminopeptidase I aus Hefe bemerkenswert stabil. Wie bereits erwähnt, kann sie bei pH 6-8 bei -20°C wenigstens 1 Jahr lang ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Auch mehrfaches Auftauen (bei Raumtemperatur) und wiederholtes Einfrieren schadet dem Enzym nicht.

Auch bei der oftmals angewendeten Konzentrierung des Enzyms mit Hilfe einer Amicon Ultrafiltrationszelle erleidet es keinen Schaden.

Die hohe Stabilität der AP I kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß man sie am Rotationsverdampfer bei 30°C sowohl bei pH 6,0 (Puffer: 50 mM Ammoniumacetat) als auch bei pH 7,3 (Puffer: 10 mM Tris/Succinat; $0,1\text{ mM Zn}^{2+}$) im Vakuum zur Trockne eindampfen kann. Nimmt man sie hinterher mit dem gleichen Volumen des gleichen Puffers wieder auf, so ist bei beiden pH - Werten nur ein etwa 10%-iger Aktivitätsverlust zu verzeichnen.

Gegenüber Gefriertrocknungen ist das Enzym wesentlich anfälliger: Lyophilisiert man die AP I in 20 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,0, so muß man mit einem ca. 40%-igem Aktivitätsverlust rechnen.

Stabilität bei verschiedenen pH-Werten, Einfluß von Aktivatoren

Auch beim Stehenlassen verdünnter Enzymlösungen im Kühlschrank bei 4°C ist die AP I ungewöhnlich gut haltbar, vor allem in Gegenwart der Aktivatoren Zn^{2+} und Br^{-} bei pH-Werten über 5,0. (siehe Abb.32 a). Läßt man die AP I ohne Aktivatoren stehen, so nimmt die Aktivität unterhalb von pH 5 stark ab, zwischen pH 5,5 und 7,0 ist jedoch nur eine geringe Inaktivierung zu verzeichnen. Oberhalb von pH 7,0 nimmt die Aktivität wieder stärker ab, bei pH-Werten 9,5 ist das Enzym praktisch vollständig inaktiviert worden.

Unter Br^{-} -Zusatz zeigt das Enzym beim Stehenlassen eine ganz andere pH-Abhängigkeit der Inaktivierung, zwischen pH 6 und 7 ist sogar eine geringfügige Aktivierung zu verzeichnen. Bei allen pH-Werten ist das aktive Enzym unter den angewendeten Bedingungen stabiler als ohne Zusatz von Bromid.

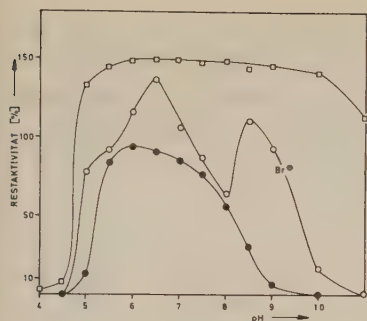


Abbildung 32 a: pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität und Einfluß von Aktivatoren beim Stehenlassen bei 4°C. Zur näheren Ausführung des Experimentes siehe methoden 2.3.6..

Das Enzym wurde 10 Wochen bei 4°C im Kühlschrank stehengelassen (●—●) ohne Aktivatoren, (○—○) in Gegenwart von 125 mM Br⁻ und (□—□) in Gegenwart

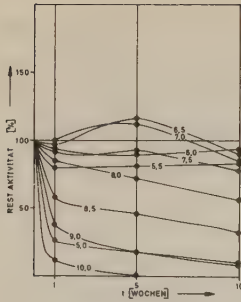
von 125 mM Br⁻ und 0,125 mM Zn²⁺. Die Aktivität, die sofort nach dem Verdünnen des Enzyms mit den jeweiligen Puffern gemessen wurde, wurde gleich 100% gesetzt.

Noch besser wird das Enzym vor Aktivitätsverlust geschützt, wenn es unter dem Zusatz von Br⁻ und Zn²⁺ aufbewahrt wird. Nach 10 Wochen ist hier sogar bei pH-Werten 5 eine ziemlich konstante Aktivierung zu beobachten.

In den Abbildungen 32 b und c ist die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung des Enzyms dargestellt, die auf die Dissoziation des aktiven Enzyms in seine inaktiven Untereinheiten zurückzuführen ist (siehe Dichtegradientenzentrifugationen). Wie man sieht, verliert die AP I ohne Aktivatorzusatz (Abb.b) innerhalb von einer Woche schnell an Aktivität bei pH 8,5-10 sowie bei pH 5,0. Danach geht die Inaktivierung langsamer vor sich. Bei den übrigen pH-Werten verliert das Enzym sehr viel weniger an Aktivität, nach 5 Wochen erfolgt bei pH 6,5 und 7,0 sogar eine geringfügige Aktivierung, nach 10 Wochen ist hier noch etwa 90% Restaktivität vorhanden.

Durch den Zusatz von Br⁻ wird das Enzym bei 4°C zwischen pH 5,0 und 7,5 und bei pH 8,5 nach einer Woche geringfügig aktiviert, danach nimmt die Aktivität wieder ab bzw. bleibt konstant (pH 8,5). Im alkalischen Bereich hingegen nimmt die Aktivität schon nach 1 Woche stark ab (pH 8,0, 9,0 und 10,0).

In Gegenwart von Zn²⁺ und Br⁻ wird die Amino-peptidase I nach einer Woche zwischen pH 5,5 und 10 stark aktiviert. Danach



steigt die Aktivität nur noch langsam an. Bei pH 5,0 macht sich erst nach 5 Wochen eine geringfügige Aktivierung bemerkbar, die sich nach zehn Wochen noch verstärkt.

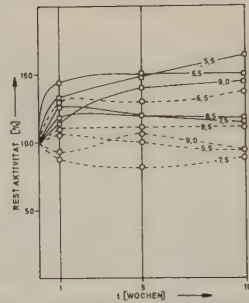
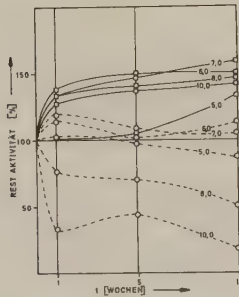


Abbildung 32 b und c: Zeitlicher Verlauf der Aminopeptidaseaktivität beim Stehenlassen bei 4°C.

Zur Ausführung siehe Methoden 2.3.6..

(●—●) AP I ohne Aktivatorzusatz, (○--○) in Gegenwart von 125 mM Br⁻ und (□—□) von 125 mM Br⁻ und 0,125 mM Zn²⁺. Die Aktivitäten, die sofort nach dem Verdünnen des Enzyms mit den jeweiligen Puffern gemessen wurden (nach 2.3.2.2.a), wurden gleich 100% gesetzt.

Puffer: pH 5,0 und 5,5 Kolthoffs Borat/Succinat (145),
pH 6,0 bis 9,0 Kolthoffs Phosphat/Borat (145) und
pH 10,0 0,1 M Borat/NaOH.

pH-Abhängigkeit der Hitzestabilität, Einfluß von Aktivatoren

Bei der Untersuchung der Hitzestabilität erkennt man die unterschiedliche Aktivierungsart der Aktivatoren Zn²⁺ und Br⁻ bzw. Cl⁻ (siehe Abb. 33). In Gegenwart von 100 µM Zn²⁺ ist die Hitzestabilität der AP I erheblich vergrößert, besonders

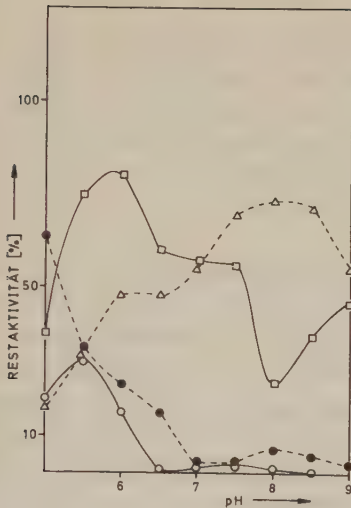


Abbildung 33: pH-Abhängigkeit der Hitzestabilität (5 Minuten bei 60°C), Einfluß von Aktivatoren

- (○—○) 0 M Zn²⁺, 0 M Br⁻
- (●—●) 0 M Zn²⁺, 60 mM Br⁻
- (□—□) 0,1 mM Zn²⁺, 0 M Br⁻
- (△—△) 0,1 mM Zn²⁺, 60 mM Br⁻

bei hohen pH-Werten. Hingegen sind die Restaktivitäten nach der Hitzebehandlung des Enzyms in Gegenwart von Br⁻ nicht wesentlich höher als in Abwesenheit des Aktivators. In Gegenwart von Zink findet man ein Maximum bei pH 6, also in dem Bereich, wo auch die Hefedipeptidase ihre größte Hitzestabilität aufweist (63). In Gegenwart von Zink und Bromid ist das Enzym im alkalischen pH-Bereich wesentlich stabiler als im sauren.

4.10. Katalytische Eigenschaften der AP I

4.10.1. Substratspezifität

Das von uns isolierte Enzym ist eine echte Aminopeptidase, die von L-Peptiden verschiedener Größe successiv die freie aminoendständige L-Aminosäure abspaltet.

In der nachfolgenden Tabelle VII sind einige Substrate des Enzyms aufgeführt, wobei die Spaltstellen durch Pfeile (▷) markiert sind.

TABELLE VII: SUBSTRATE DER AP I

500 μ l 5 mM Substratlösungen in Phosphat/Borat-Puffer (pH 7,8; 0,1 mM Zn^{2+} ; 0,1 M NaCl) wurden mit 50 μ l AP I (ca. 0,2 mg/ml) bei 40°C inkubiert. Nach 10, 30 und 60 Minuten sowie nach 12 h wurden Proben entnommen und zur Identifizierung der Spaltprodukte chromatographiert (siehe Methoden).

L-Leu ∇ -Gly-Gly	L-Ala ∇ -L-Thr-L-Ala	
L-Leu ∇ -Gly-L-Leu	L-Ala ∇ -L-Thr-L-Ala-OMe	L-Leu ∇ -NH ₂
L-Phe ∇ -Gly-Gly	L-Ala ∇ -L-Thr-Gly-OMe	L-Phe ∇ -NH ₂
L-Val ∇ -Gly-Gly	L-Ala ∇ -L-Asp ∇ -L-Phe ∇ -OMe	L-Leu ∇ -OMe
L-Ala ∇ -Gly-Gly	L-Val ∇ -L-Ala ∇ -L-Thr-L-Ala	L-Phe ∇ -OMe
Gly ∇ -Gly-Gly	L-Phe ∇ -L-Val-Gly-OMe	
	L-Ser ∇ -L-Phe ∇ -L-Val-Gly	

Gespalten wurden außerdem die in Tabelle IX angegebenen Dipeptide. Nicht gespalten wurden die Tripeptide Pro-Gly-Gly und D-Leu-Gly-Gly.

Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Dipeptide Gly-Gly, L-Thr-L-Ala und L-Val-Gly nicht merklich gespalten, erst nach 12 h war hier eine geringfügige Spaltung zu verzeichnen. Bei den Peptidderivaten Boc-Val-Ala-Thr-Ala und N-Formyl-Gly-Gly traten auch nach 12 h keine Spaltprodukte auf. Da keine der chromatographierten Proben neue unbekannte Peptide aufwies, ist unter diesen Bedingungen Transamidaseaktivität auszuschließen.

Die Tabellen VIII und IX geben Auskunft über die Substratspezifität der Aminopeptidase I.

In Tabelle VIII sind zum Vergleich die relativen Geschwindigkeiten der nach GRASSMANN (16) isolierten (siehe 3.2.) sowie die der teilweise gereinigten Aminopeptidase II (siehe 3.4.) mit aufgeführt.

Wie aus den nachfolgenden Tabellen hervorgeht, ist die AP I aus Hefe den sogenannten Leicinaminopeptidasen zuzuordnen. Es werden alle Peptid- und Aminosäurederivate gespalten, so

fern sie eine freie α -Aminogruppe aufweisen.

Substrate mit Leucin oder anderen hydrophoben Aminosäuren in N-terminaler Stellung werden am besten gespalten, während Peptide mit Glycin oder geladenen Aminosäuren in dieser Stellung nur sehr schlecht umgesetzt werden. So ist Leu-Gly-Gly ein sehr viel besseres Substrat als Gly-Gly-Gly. Pro-Gly-Gly wird nicht gespalten, das Enzym besitzt also keine Prolidaseaktivität.

Man kann auch erkennen, daß Tripeptide und deren Ester wesentlich bessere Substrate darstellen als die entsprechenden Dipeptide und deren Derivate, und als Aminosäureamide oder Aminosäureester.

Der Einfluß der dritten Aminosäure auf die Spaltungsgeschwindigkeit wird deutlich, wenn man die Tripeptide Leu-Gly-Gly und Leu-Gly-Leu miteinander vergleicht, von denen das letztere fast doppelt so schnell gespalten wird. Auch hier führt wieder die Vergrößerung der Seitenkette zu erhöhter Spaltungsgeschwindigkeit.

Bemerkenswert ist die geringe Geschwindigkeit, mit der Val-Gly-Gly gespalten wird und die hohe Hydrolysegeschwindigkeit von Ala-Thr-Ala, das etwa 6 mal schneller umgesetzt wird als Ala-Gly-Gly.

Bei der Spaltung der Dipeptide ist eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit zu verzeichnen, wenn Alanin als carboxylständige Aminosäure fungiert. So wird Gly-Ala 5,5 mal schneller gespalten als Gly-Gly, während bei dem Paar Leu-Gly und Leu-Ala das Verhältnis 1:1,55 beträgt.

Die Dipeptide Val-Gly und Thr-Ala werden nicht gespalten, wohl aber Gly-Val und Ala-Thr.

Aminosäure-p-Nitroanilide sind nur sehr schlechte Substrate, wegen ihres hohen Extinktionskoeffizienten zu Routinemessungen aber sehr nützlich.

Die Tabelle VIII läßt auch erkennen, daß die nach GRASSMANN (siehe 3.2.) aufgearbeitete Aminopeptidase die gemessenen Substrate mit der gleichen Geschwindigkeit spaltet wie das von uns isolierte Enzym. Hingegen zeigt die teilweise gereinigte Aminopeptidase II eine ganz andere Substratspezifität als die Aminopeptidase I.

TABELLE VIII: SUBSTRATSPEZIFITÄTEN VON AMINOPEPTIDASE-PRÄPARATIONEN AUS HEFE

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolysen wurden bei Substratkonzentrationen von 10 mM in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 7,8; 0,1 M NaCl; 0,1 mM Zn^{2+}) bestimmt.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Hydrolysegeschwindigkeit von Leu-Gly-Gly, die gleich 100 gesetzt wurde.

Substrate	Relative Aktivitäten		
	AP I	AP I (G) ^{a)}	AP II ^{b)}
L-Leu-Gly-Gly	100	100	100
L-Phe-Gly-Gly	89	-	-
L-Val-Gly-Gly	3	-	-
L-Ala-Gly-Gly	91	91	9
Gly-Gly-Gly	7	-	-
L-Leu-Gly-L-Leu	171	-	-
L-Leu-Gly	14,4	13,5	-
L-Leu-NH ₂	8,1	7,9	-
L-Leu-OMe	10,2	-	-
L-Leu-β-Ala	6,9	-	-
L-Phe-Gly	23	-	-
L-Phe-OMe	11	-	-
L-Ala-L-Thr-L-Ala	509	-	-
L-Ala-L-Thr-L-Ala-OMe	336	369	59
L-Ala-L-Thr-Gly-OMe	418	432	80
L-Ala-L-Asp-L-Phe-OMe	134	-	-
L-Leu-p-NA ^{c)}	1,3	-	-
L-Lys-p-NA ^{c)}	0,02	-	-
Gly-p-NA ^{c)}	0,05	-	-
Form-Gly-Gly	0	0	-
Boc-L-Val-L-Ala-			
L-Thr-L-Ala	0	0	-

a) gemessen mit einer Präparation, die nach GRASSMANN (16) gereinigt wurde.

b) gemessen mit der AP II (siehe 3.4.).

c) Substratkonzentration 2 mM.

TABELLE IX: HYDROLYSE VON DIPEPTIDEN DURCH AP I

Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe des Aminosäureanalysators (siehe Methoden) bei einer Substratkonzentration von 40 mM gemessen und auf die Hydrolysegeschwindigkeit von L-Leu-Gly bezogen, die gleich 100 gesetzt wurde.

Substrate	Rel. Aktivität	Substrate	Rel. Aktivität
Gly-Gly	1,0	Pro-Gly	0
Gly-Ala	5,5	Val-Gly	0,1
Gly-Leu	2,1	Thr-Ala	0,1
Ala-Gly	19,7	Ala-Thr	36,5
Ala-Leu	49,4		
Leu-Gly	100		
Leu-Ala	155		
Leu-Leu	116		

4.10.2. Einfluß von Effektoren auf die Enzymaktivität

a) Metallchelatoren

Die Aminopeptidase I aus Hefe ist wie viele andere Peptidasen auch (siehe Tabelle I und II) ein Metall-Enzym. Werden ihm die Metallionen entzogen, so verliert das Enzym seine Aktivität.

Die absolute Erfordernis von Metallionen zur Aktivitätsentfaltung wird in Abbildung 34 verdeutlicht, in der die Abhängigkeit der relativen Enzymaktivität von der Konzentration verschiedener Metallchelatoren dargestellt ist.

Besonders wirksam bei der Inaktivierung der Aminopeptidase I (fast vollständige Hemmung bei einer Konzentration von nur 1 μ M) ist EDTA, während o-Phenanthrolin erst bei höheren Konzentrationen hemmt. Das gleiche gilt auch für die SH-Verbindungen Cystein (Cys), Dimercaptopropanol (BAL) und Dithio-

erythrit (DTE), deren Einfluß ebenfalls in Abbildung 34 dargestellt ist.

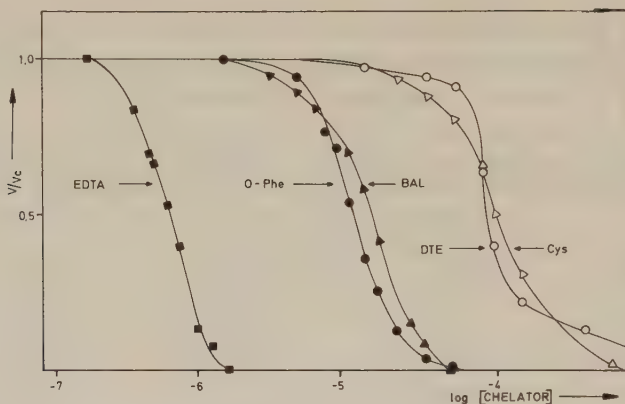


Abbildung 34: Abhängigkeit der relativen Aminopeptidaseaktivität von der Metallchelatorenkonzentration. Die AP I wurde nach vorangegangener 42-stündiger Dialyse gegen 10 L 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,8, 15 Minuten bei 40°C in Kolt-hoff-Puffer (145), pH 7,8, mit der angegebenen Konzentration an Chelator vorinkubiert. Die Messung der Aktivitäten erfolgte nach 2.3.2.2.a mit Leu-Gly-Gly als Substrat.

V_c = RG bei 0 M Chelator, V = RG bei X M Chelator.

b) Reaktivierung des Enzyms durch Me^{2+}

Nachdem im vorangegangenen Experiment bewiesen wurde, daß die Aminopeptidase I durch Metallchelatoren inaktiviert wird, erhebt sich nun die Frage, ob und durch welche Metallionen das Enzym reaktiviert werden kann. Die Antwort darauf ergibt sich aus Experimenten, die nach 2.3.4.b durchgeführt wurden (siehe Methoden) und deren Ergebnisse in Tabelle X dargestellt sind.

Wie man sieht (Tabelle X, Spalte a) ist von den getesteten Metallionen nur Zn^{2+} in der Lage, die Hemmung durch EDTA vollständig rückgängig zu machen. Daneben vermögen noch Co^{2+} -Ionen in geringem Maße zu aktivieren. Die restlichen unter-

TABELLE X: REAKTIVIERUNG VON EDTA-BEHANDELTER AP I DURCH ZWEIWERTIGE METALLIONEN

Mehrere Enzymproben wurden bei 4°C gegen EDTA-Lösung (10^{-3} M in 0,2 M Ammoniumacetatpuffer, pH 6,0, 72 h) und anschließend 2 x 24 h gegen 10^{-3} M Me^{2+} im gleichen Puffer dialysiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach 2.3.2.2.a mit Leu-Gly-Gly als Substrat nach Vorinkubation (15 Minuten, 40°C) im üblichen Testpuffer in Gegenwart der angegebenen Metallionen und

- a) 0 M Br^- , 0 M Zn^{2+} , b) 0 M Br^- , 0,05 mM Zn^{2+} und
c) 100 mM Br^- , 0,05 mM Zn^{2+} .

Aktivitätstest nach

AP I vorbe- handelt mit	a) V/V_C	b) V/V_C	c) V/V_C
ohne Me^{2+}	1,00	4,01	6,05
Zn^{2+}	3,06	4,99	7,30
Co^{2+}	1,23	4,11	1,41
Mn^{2+}	0,70	3,88	3,26
Mg^{2+}	0,24	3,55	6,37
Fe^{2+}	0,26	1,59	1,57
Cu^{2+}	0,19	2,60	1,95
Ni^{2+}	0,15	2,08	1,25

V_C = Volumenaktivität des gegen 0 M Me^{2+} im Puffer dialysierten Enzyms, gemessen wie unter a).

suchten zweiwertigen Metallionen hemmen das Enzym. Die hohe Affinität des Enzyms zu Zn^{2+} verdeutlichen die Werte in der Spalte b der obigen Tabelle, wo den einzelnen Aktivitätstests neben den bereits vorhandenen Metallen noch zusätzlich Zn^{2+} zugefügt worden ist, was in allen Fällen zu einer Aktivitätssteigerung führte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Zn^{2+} die anderen zweiwertigen Metallionen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängen

kann.

Aus der Spalte c der obigen Tabelle kann man ersehen, daß der Zusatz von Br^- die Aktivität noch weiter steigern kann. Bemerkenswert ist, daß sich nur mit Zn^{2+} und Mg^{2+} behandeltes Enzym durch Br^- plus Zn^{2+} noch weiter aktivieren läßt, nicht aber gegen Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} dialysierte Proben (vergleiche Spalte b und c).

c) Einfluß von Anionen auf die Amino-peptidaseaktivität

Zur Beantwortung der Frage, ob neben Br^- auch noch andere Anionen in der Lage sind, die Amino-peptidaseaktivität zu beeinflussen, wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität in Gegenwart von $0,05 \text{ mM Zn}^{2+}$ von der Konzentration verschiedener Anionen untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 dargestellt.

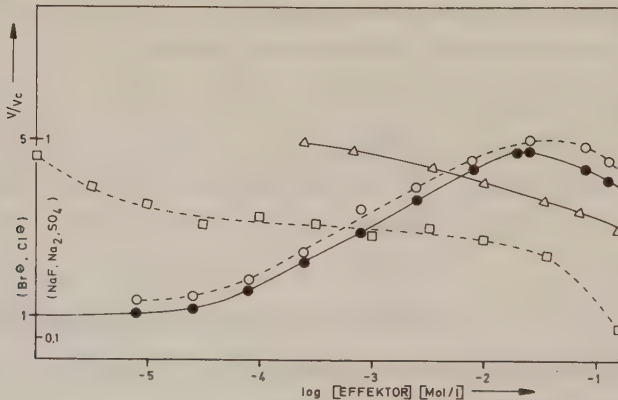


Abbildung 35: Einfluß von KBr (●—●), NaCl (○—○), NaF (□--□) und Na_2SO_4 (Δ—Δ) auf die Spaltung von Leu-Gly-Gly durch die Amino-peptidase I (EDTA-Enzym nach 2.3.3.) bei einer Zink-Konzentration von $0,05 \text{ mM}$.

Die AP I wurde bei 40°C in Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer, pH 7,8, 15 Minuten mit $0,05 \text{ mM Zn}^{2+}$ und den angegebenen Anionenkonzentrationen vorinkubiert.

V_c = RG ohne Zusatz von Anionen, V = RG nach Zusatz von Anionen.

Man kann erkennen, daß neben Br^- auch Cl^- aktiviert, wobei bei Chlorid die maximale Aktivierung bei etwas höheren Konzentrationen erreicht wird.

Bei der Aktivierung des Enzyms durch die Anionen Br^- und Cl^- spielen die Kationen K^+ und Na^+ keine Rolle; NaCl , NaBr , KCl und KBr aktivieren im gleichem Maße.

Ebenso kann der Aktivierungseffekt nicht auf Spuren von Zn^{2+} im Puffer zurückzuführen sein, da die verwendeten Salze weniger als 0,1 ppm Zn^{2+} enthielten.

Im Gegensatz zu Cl^- und Br^- wird das Enzym durch F^- gehemmt. Natriumsulfat wirkt sich erst bei recht hohen Konzentrationen auf die Peptidaseaktivität aus.

d) Reaktivierung von EDTA-behandelter Amino-peptidase I durch Zn^{2+} und Br^-

Wie die Versuche zur Reaktivierung von EDTA-behandeltem Enzym mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen ergaben (siehe vorn), konnte die Inaktivierung nur durch Zn^{2+} rückgängig gemacht werden. Eine weitere Aktivitätssteigerung konnte dort durch den Zusatz von Br^- und Zn^{2+} erzielt werden.

Zur Untersuchung der in Abbildung 36 dargestellten Abhängigkeit der Amino-peptidaseaktivität von der Zn^{2+} - und Br^- -Konzentration wurden Enzymlösungen verwendet, die nach 2.3.3. (siehe Methoden) von EDTA befreit wurden und die 0,04 μM Zn^{2+} (siehe Zink-Gehalt der AP I) enthalten. Wie man sieht, weisen sie noch eine geringe Restaktivität auf, die durch Zusatz von weiterem Zn^{2+} oder Br^- erheblich gesteigert werden kann.

Die Abhängigkeit der Aktivität von der freien Zink-Konzentration läßt vermuten, daß das Enzym wenigstens 2 verschiedene Zink-Bindungsstellen aufweist, die sich in ihrer Affinität zum Metall unterscheiden.

Da das Enzym bei Zn^{2+} -Konzentrationen im Puffer, die weit unter den zur Aktivierung benötigten liegen, noch aktiv ist, scheint es essentielles Zink zu enthalten.

Es ist jedoch sehr schwierig, Zn^{2+} -Konzentrationen im Puffer einzustellen, die kleiner als 10^{-7} M sind. Durch die Ver-

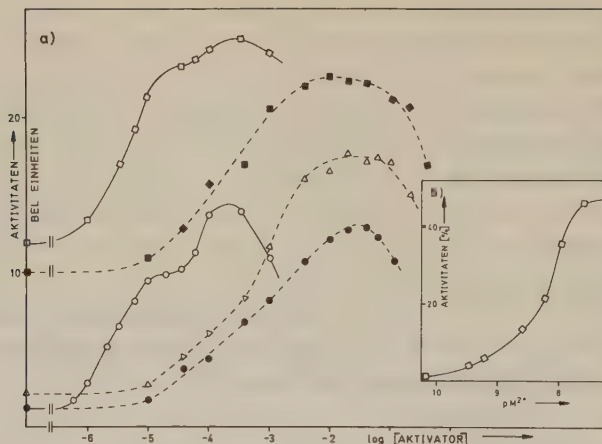


Abbildung 36: Reaktivierung der AP I nach EDTA-Behandlung (siehe 2.3.3.). Die Durchführung des Experimentes erfolgte nach 2.3.4.a. In Abbildung 36 a ist die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Logarithmus der eingesetzten Zink- und Bromid-Konzentrationen aufgetragen.

Amino-peptidaseaktivität in Abhängigkeit von der Zn^{2+} -Konzentration ohne Br^- (○—○) und mit 100 mM Br^- (□—□); Amino-peptidaseaktivität in Abhängigkeit von der Br^- -Konzentration ohne Zn^{2+} (●—●), mit 10^{-6} M Zn^{2+} (△—△) und mit 5×10^{-5} M Zn^{2+} (■—■).

In Abbildung 36 b wurden die Zink-Konzentrationen (Verwendung eines Zn^{2+} /Nitrilotriessigsäure-Puffers nach WILSON und COHEN (151) berechnet, die Aktivitäten sind gegen den negativen Logarithmus der freien Zink-Konzentrationen aufgetragen.

wendung von Zn^{2+} /Nitrilotriessigsäure-Puffern (siehe Methoden) ist es jedoch möglich, die Zn^{2+} -Konzentrationen bis auf 10^{-11} M herabzusetzen und dadurch die Bindungskonstante für dieses fester gebundene Zink zu bestimmen. Wie man aus Abbildung 36 b ersehen kann, liegen die Zink-Konzentrationen für die halbmaximale Sättigung dieser Zink-Bindungsstelle etwa um drei Zehnerpotenzen niedriger als die Konzentrationen, die man zur Aktivierung benötigt.

Schon bei einer Konzentration von 6×10^{-9} M Zn^{2+} ist die erste Zink-Bindungsstelle gesättigt. Wie bei der Bestimmung des Zink-Gehaltes des Enzyms festgestellt worden ist, enthält EDTA-behandelte Amino-peptidase I noch etwa 2 g Atome Zink pro 6×10^5 daltons bei sehr niedrigen Zn^{2+} -Konzentrationen im Puffer (siehe oben). Dieser Befund steht in sehr guter Übereinstimmung mit den in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnissen.

Erst bei $1 \mu\text{M}$ Zn^{2+} kann dann eine weitere Aktivierung des Enzyms erreicht werden. Bei einer Zn^{2+} -Konzentration von 10^{-5} bis etwa 5×10^{-5} M nimmt die Aktivität wiederum nur wenig zu, was vermuten läßt, daß hier auch die zweite Gruppe von Zink-Bindungsstellen abgesättigt ist. Bei einer weiteren Erhöhung der Zn^{2+} -Konzentration im Puffer nimmt die Aktivität nochmals zu, wenn auch nicht in dem Maße wie vorher. Die maximale Aktivität ist erreicht bei etwa $0,3 \text{ mM}$ Zn^{2+} . Bei noch höheren Zink-Konzentrationen nimmt die Aktivität wieder ab, was eventuell darauf zurückzuführen ist, daß die aktuelle Zn^{2+} -Konzentration bei diesem pH (7,8) durch die vermehrte Bildung von Zink-Hydroxykomplexen und schwerlöslichem Zinkhydroxid herabgesetzt wird (87).

Man kann aus Abbildung 36 a auch erkennen, daß Br^- bei diesem pH-Wert nahezu in gleichem Maße aktiviert wie Zn^{2+} . Die maximale Aktivität wird durch den Zusatz von Zn^{2+} und Br^- erreicht, wobei es gleichgültig erscheint, ob man zur Aktivierung niedrige Zn^{2+} - und höhere Br^- -Konzentrationen oder umgekehrt verwendet. Die höchsten Aktivitäten wurden erzielt bei $0,3 \text{ mM}$ Zn^{2+} in Gegenwart von 100 mM Br^- und 10 mM Br^- in Gegenwart von $50 \mu\text{M}$ Zn^{2+} .

Bei niedrigeren Zink-Konzentrationen werden durch Zusatz von Br^- geringere Aktivitäten erreicht, wobei diese um so kleiner sind, je weniger Zink der Aktivitätstest enthält.

GRASSMANN (59) und SCHNEIDER (17-20) berichteten, daß die von ihnen untersuchte Amino-peptidase aus Hefe Dipeptide nur spalten sollte, wenn dem Aktivitätstest Cl^- -Ionen zugefügt wurden. Interessant war also die Frage, ob die Aktivierung

des Enzyms durch Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- mit Dipeptiden und Tripeptiden als Substraten parallel verlaufen.

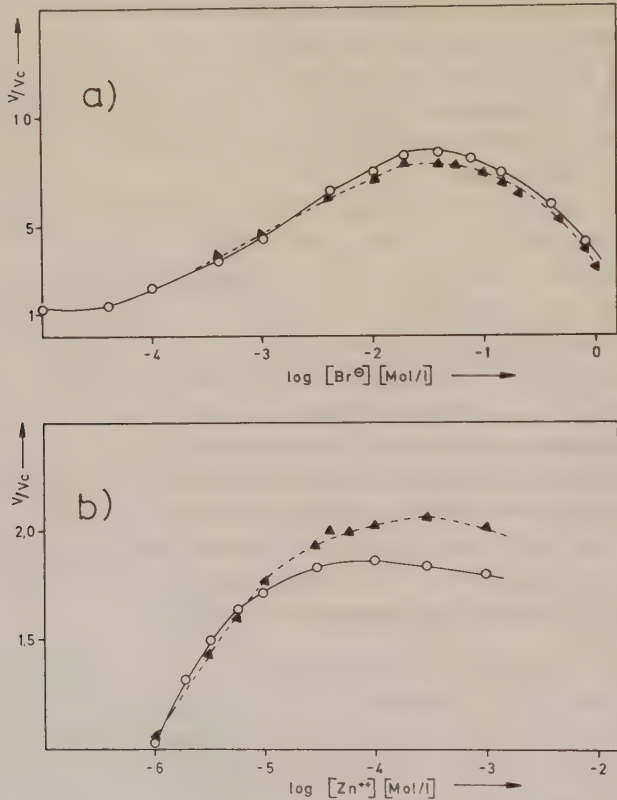


Abbildung 37 a und b: Einfluß von Br^- (a) auf die Peptidaseaktivität gegenüber Leu-Leu (○—○) und Leu-Gly-Gly (▲—▲) bei einer Zink-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und Einfluß von Zn^{2+} (b) mit den Substraten Leu-Leu (○—○) und Leu-Gly-Gly (▲—▲) bei einer Bromid-Konzentration von 60 mM . Zur Aktivitätsmessung wurde nach 2.3.3. mit EDTA-behandeltes Enzym verwendet.

Substratkonzentrationen: 10 mM mit Leu-Leu und 20 mM mit Leu-Gly-Gly.

Vorinkubation mit Aktivator: 15 Minuten bei 40°C und $\text{pH } 7,8$.

V_C = RG ohne, V = RG mit Aktivator.

Wie die Abbildungen 37 a und b zeigen, ist dies der Fall. Zn^{2+} und Cl^- aktivieren die enzymatische Spaltung sowohl des Dipeptides Leu-Leu als auch des Tripeptides Leu-Gly-Gly in sehr ähnlicher Weise.

e) pH-Abhängigkeit des Enzyms, Einfluß von Aktivatoren

Zur Bestimmung der pH-Optima des Enzyms wurde an DEAE-Celulose rechromatographiertes Enzym verwendet. Zur Aktivitätsbestimmung nach 2.3.2.2. wurden bei pH 5,0-5,75 Kolthoffs Borat/Succinat-Puffer, bei pH 6,0-9,25 Kolthoffs Phosphat/Borat-Puffer (145) verwendet. Den Ansätzen zur Aktivitätsbestimmung wurde weder Zn^{2+} noch Cl^- -Ionen zugefügt.

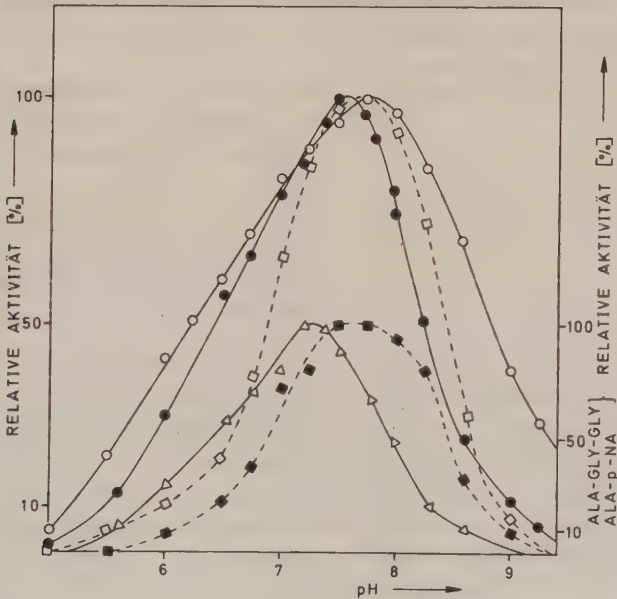


Abbildung 38: pH-Abhängigkeit der AP I mit verschiedenen Substraten.

(●—●) Leu-Gly-Gly, (○—○) Leu-Gly, (□—□) Leu-p-NA, (△—△) Ala-Gly-Gly und (■—■) Ala-p-NA.

Aus der obigen Abbildung lassen sich für die verschiedenen

Substrate folgende pH-Optima ablesen:

Leu-Gly-Gly pH 7,6, Leu-Gly pH 7,8

Ala-Gly-Gly pH 7,2, Leu-p-NA pH 7,7 und Ala-p-NA pH 7,5-7,7.

In dem eben beschriebenen Experiment wurde an DEAE-Cellulose rechromatographiertes Enzym verwendet, das 0,1 mM Zn^{2+} und ca. 0,15 M NaCl enthielt. Im Aktivitätstest nach 2.3.2.2. wurde das Enzym etwa 1:30 verdünnt, der Testansatz war also etwa 3×10^{-6} M an Zn^{2+} und 5 mM an NaCl.

Nun stellt sich die Frage, ob die Aktivierung durch Zn^{2+} und Cl^- bzw. Br^- pH-abhängig ist und ob sich der Zusatz von Aktivatoren auf die Lage der Aktivitätsoptima auswirkt.

Zur Klärung dieser Frage wurde das Experiment durchgeführt, das in 2.3.5. näher beschrieben wurde (siehe Methoden).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 zu sehen.

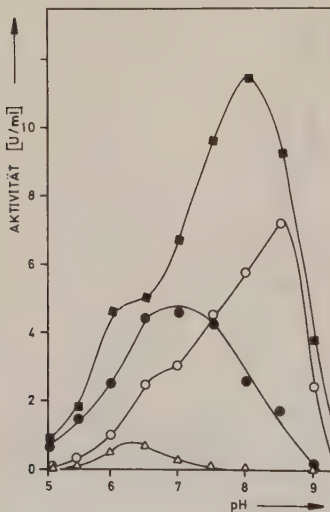


Abbildung 39: pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität und Einfluß von Aktivatoren.

($\triangle$ — $\triangle$) ohne Zn^{2+} und Br^- ,
($\circ$ — $\circ$) 60 mM Br^- ,
($\bullet$ — $\bullet$) 0,1 mM Zn^{2+} und
($\blacksquare$ — $\blacksquare$) 0,1 mM Zn^{2+} und
60 mM Br^- .

Zur Durchführung des Experimentes siehe Methoden 2.3.5..

Wie man sieht, gibt die Abbildung 38 nicht die pH-Abhängigkeit der Katalyse selbst, sondern vielmehr die der Aktivierung durch Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- wieder. Bei sehr niedrigen Aktivatorkonzentrationen liegt das pH-Optimum der enzyma-

tischen Spaltung von Leu-Gly-Gly zwischen pH 6,0 und 6,5, während es bei hohen Aktivatorkonzentrationen deutlich nach höheren pH-Werten verschoben ist.

Der in Abbildung 40 dargestellte Grad der relativen Aktivierung durch die genannten Aktivatoren zeigt ein deutliches Minimum dort, wo man ohne Aktivatorzusatz das pH-Optimum

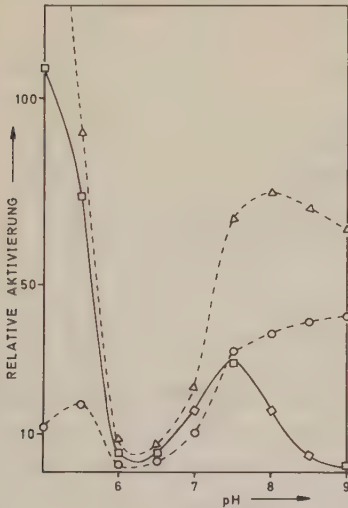


Abbildung 40: pH-Abhängigkeit der relativen Aktivierung durch Zn^{2+} (□), Br^- (○) und Zn^{2+} und Br^- (Δ).

Zur Durchführung des Versuches siehe Methoden 2.3.5..

Vergleiche auch Abbildung 39.

Aktivität ohne Zn^{2+} und Br^- = 1 bei jedem pH.

findet. Die Aktivierung durch Bromid steigt dann bis pH 8,5 an, während die relative Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Zn^{2+} oberhalb von pH 7,5 abnimmt, was jedoch wahrscheinlich auf die Abnahme der freien Zink-Konzentration durch zunehmende Bildung von Zn^{2+} -Hydroxykomplexen bei höheren pH-Werten zurückzuführen ist (87).

4.10.6. Kinetik

In der nachfolgenden Tabelle sind die kinetischen Konstanten einiger ausgewählter Di- und Tripeptide aufgeführt.

Das Tripeptid Ala-Thr-Ala ist eines der besten Substrate des Enzyms, wird es aber um die Aminosäure Valin verlängert, so

TABELLE XI: KINETISCHE DATEN DER PEPTIDHYDROLYSE
DURCH DIE AP I

Die Bestimmung der Spaltgeschwindigkeiten erfolgte nach 2.3.2.2. bei 40°C. Die Auswertung erfolgte graphisch aus Diagrammen nach LINEWEAVER - BURK.

Substrate	$v^a)$	K (mM)	Substrate	$v^a)$	K (mM)
Ala-Gly	1,5	40	Leu-Gly	13	23
Ala-Gly-Gly	100	12	Leu-Ala	15	7
Ala-Gly-Gly-OEt	210	14	Leu-Leu	11	5,5

Ala-Thr	1,6	6	Thr-Ala	0	1,6 ^{b)}
Ala-Thr-Ala	190	3,2	Val-Ala	0	5 ^{b)}
Ala-Thr-Ala-OMe	170	2,7			
Val-Ala-Thr-Ala ^{c)}	7	4			

Leu-Gly-Leu	90	7			

a) bezogen auf Ala-Gly-Gly mit 100

b) K_I (Spaltung von Ala-Thr-Ala)

c) mit Hilfe des Aminosäureanalysators gemessen

wird vom entstandenen Tetrapeptid Val-Ala-Thr-Ala Valin etwa 27 mal langsamer abgespalten als Alanin vom Tripeptid. Die Endprodukte der enzymatischen Spaltung sind die Aminosäuren Valin und Alanin sowie das Dipeptid Thr-Ala, das von dem Enzym zwar gebunden, aber nicht gespalten wird, und somit als kompetitiver Inhibitor bei der Spaltung sowohl des Tetrapeptides als auch des Tripeptides wirkt.

Mit den kinetischen Daten aus Tabelle XI wurde der zeitliche Verlauf der Spaltung des obigen Tetrapeptides mit Hilfe eines Computerprogrammes simuliert (164). Man ging dabei von der Annahme aus, daß der Abbau einem linearen sequentiellen Modell folgt $A \xrightarrow{\quad} B \xrightarrow{\quad} C \xrightarrow{\quad}$, wobei die Zwischenprodukte frei mit dem Substrat um das aktive Zentrum des En-

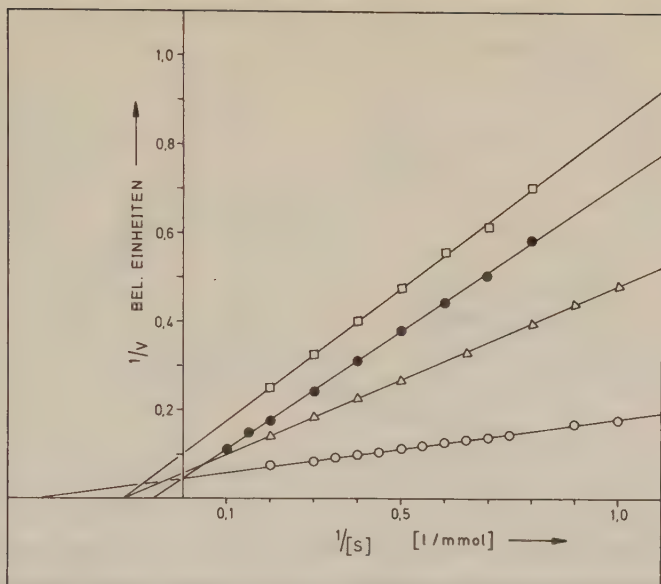


Abbildung 41: LINEWEAVER - BURK - Diagramm zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Peptidhydrolysen von Leu-Ala (Δ), Leu-Gly-Leu ($\square$), Ala-Thr-Ala ($\circ$) und Ala-Gly-Gly ($\bullet$) durch die Aminopeptidase I.

zyms konkurrieren.

Der durch die Computersimulation erhaltene zeitliche Verlauf der hydrolytischen Spaltung des Tetrapeptides ist in Abbildung 42 wiedergegeben. Zum Vergleich sind auch die experimentellen Meßpunkte eingetragen.

Einfluß von Zn^{2+} und Br^- auf die Kinetik von Ala-Thr-Ala-OMe

Zur Klärung der Frage, wie die Aktivatoren Zn^{2+} und Br^- wirken, wurden kinetische Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse in den Abbildungen 43 a und b sowie in der Tabelle XII wiedergegeben sind.

In Abwesenheit von Halogenidionen erhält man mit dem sehr guten Peptidsubstrat Ala-Thr-Ala-OMe nichthyperbolische

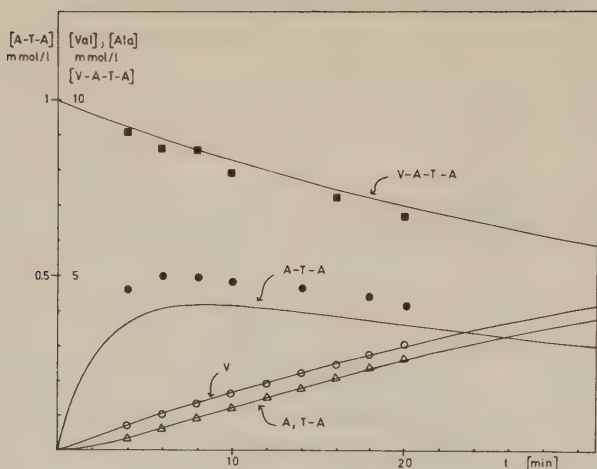
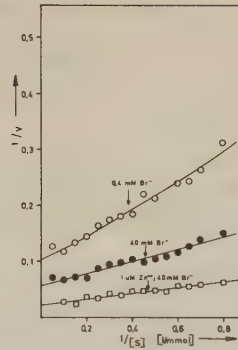


Abbildung 42: Zeitlicher Verlauf der hydrolytischen Spaltung von V-A-T-A durch die AP I bei einer anfänglichen Substratkonzentration von 10 mM. Die Konzentrationen von Val-Ala-Thr-Ala (■), Ala-Thr-Ala (●), Val (○) und Ala (△) sind gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Das Experiment wurde nach 2.3.2.2.c (siehe Methoden) durchgeführt. Die Werte von Thr-Ala sind mit denen von Ala identisch. Zu beachten ist die besondere Skala für Ala-Thr-Ala. Die durchgezogenen Kurven stellen das Ergebnis der Computersimulation dar.

Kinetiken. Unter diesen Bedingungen liegt der HILL-Koeffffizient, der ein Maß für die Sigmoidität der Kinetik darstellt, etwa bei $n_H = 1,7$.

Mit steigenden Zn^{2+} -Konzentrationen nimmt die Maximalgeschwindigkeit V_{max} zu, während $K_{M,app}$ und n_H kaum beeinflusst werden.

Bromid wirkt im Gegensatz zu Zink als allosterischer Effektor, indem es schon in geringen Konzentrationen die normale Michaelis-Menten-Kinetik wiederherstellt. Gleichzeitig wird V_{max} vergrößert und $K_{M,app}$ verringert. Demgemäß ist die Aktivierung durch Br^- bzw. Cl^- bei niedrigen Substratkonzen-



Abbildungen 43 a und b: Einfluß von Zn^{2+} und Br^- auf die Kinetik der Hydrolyse von Ala-Thr-Ala-OMe. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden mit EDTA-behandeltem Enzym (siehe 2.3.3.) bestimmt, wobei Ala-Thr-Ala-OMe als Substrat diente.

(○) Kinetik mit $0,1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und ohne Br^- ,
(●) $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und 0 M Br^- sowie (□) $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und 0 M Br^- in Abbildung 43 a.

(○) Kinetik mit $0,1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und $0,4 \text{ mM Br}^-$ und (●) 40 mM Br^- sowie mit (□) $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und 40 mM Br^- in 43 b.

Es wird das Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt mit doppelt reziproker Auftragung.

Die durchgezogenen Kurven stellen die vom Computer berechneten besten Fits der HILL-Gleichung an die Meßpunkte dar.

trationen größer als bei hohen $[\text{S}]$, was in Abbildung 43 b deutlich zu sehen ist.

Der unterschiedliche Mechanismus bei der Aktivierung des Enzyms durch Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- tritt auch bei der Wirkung beider Aktivatoren auf die Hitzestabilität des Enzyms zutage (siehe vorn).

TABELLE XII : KINETISCHE DATEN DER SPALTUNG VON ALA-THR-ALA-OMe IN GEGENWART VON AKTIVATOREN

Die kinetischen Konstanten wurden aus den Experimenten erhalten, die wie oben (siehe Text zu Abb. 43 a und b) durchgeführt wurden.

Die Maximalgeschwindigkeiten $V_{\max}$, die scheinbaren Michaelis-Konstanten $K_{M,app}$ (mmol/l) und die HILL-Koeffizienten n_H wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes berechnet (siehe Methoden).

Aktivatorkonz.			0 M Br^-	0,4 mM Br^-	40 mM Br^-
0 μM	Zn^{2+}	$V_{\max}$	6,5	9,6	18
		$K_{M,app}$	18,5	2,4	2,0
		n_H	1,71	1,12	1,05
1 μM	Zn^{2+}	$V_{\max}$	22	38	48
		$K_{M,app}$	17,5	4,5	2,6
		n_H	1,58	0,94	0,95
100 μM	Zn^{2+}	$V_{\max}$	37	50	54
		$K_{M,app}$	25,3	5,0	3,0
		n_H	1,73	1,02	1,03

4.11. Chemische Modifizierung des Enzyms

Um einige Hinweise auf etwaige an der Katalyse beteiligte Aminosäuren zu erhalten, wurde das Enzym mit Proteinmodifizierungsreagentien behandelt (siehe Methoden 2.3.8.) bzw. der Photooxidation unterworfen und die Wirkung auf die Amino-peptidaseaktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIV zusammengestellt.

Wie man sieht, zeigt 10 mM Jodacetamid keinen Effekt. NEM hemmt erst bei relativ hohen Konzentrationen. Mit 10 mM Tetra-

nitromethan, einem Reagenz zur Nitrierung von Tyrosin, ist ebenso wie mit 4 mM l-H-Diazotetrazol, das vorwiegend mit Tryptophan und Lysin neben Histidin und Tyrosin reagiert, keine Hemmung zu erzielen.

Carbonsäureanhydride und Diäthylpyrocarbonat jedoch inaktivieren das Enzym irreversibel.

Auch Phenylmethylsulfonylfluorid, ein Reagenz, das spezifisch mit Serin reagiert, führt zu vollständiger irreversibler Hemmung.

Bei der Photooxidation des Enzyms verliert dieses unter den Versuchsbedingungen (siehe Methoden) nach 12 Minuten 50% seiner Aktivität.

TABELLE XIII: CHEMISCHE MODIFIZIERUNG DER AP I (149)

Zur Durchführung der Experimente siehe Methoden 2.3.8..

Reagenz	(I) _{50%}	Reag. Aminosäure
I. Hemmung		
N-Äthylmaleinimid	16 mM	Cys
Bernsteinsäureanhydrid	4,5 mM	Lys
Essigsäureanhydrid	2 mM	Lys
Diäthylpyrocarbonat	6,5 mM	His, Glu, Asp, Lys, Tyr
Phenylmethylsulfonylfluorid	5 mM	Ser
Photooxidation	12 Min.	Cys, His, Trp, Met
II. keine Hemmung		
Tetranitromethan	10 mM	Tyr
l-H-Diazotetrazol	4 mM	Trp, His
Jodacetamid	10 mM	Cys, His, Lys

(I)_{50%} = 50% Inaktivierung

5. DISKUSSION

5.1. Vergleich der von GRASSMANN und JOHNSON beschriebenen Aminopeptidasen mit der AP I

In der Literatur sind bis heute schon sehr viele Aminopeptidasen aus verschiedenen Organismen beschrieben. Einige wenige davon sind in der Tabelle II (siehe vorn) als Beispiele aufgeführt. Die wenigsten der bis heute bekannten Aminopeptidasen sind jedoch in einheitlicher Form dargestellt worden und gut charakterisiert. Wohl am besten untersucht sind die Leucinaminopeptidasen aus Schweinenieren und Rinderaugenzellen, die Alaninaminopeptidasen aus menschlicher Leber und Schweinenieren sowie die Dipeptidyl-Aminopeptidase, das Cathepsin C (Literatur: siehe Tabelle II).

In den letzten 30 Jahren, in denen die Enzymforschung gewaltige Fortschritte gemacht hat, bedingt durch verbesserte Darstellungsmethoden (Säulenchromatographie, Elektrophoresen usw.) und die leichtere Zugänglichkeit von Substraten, ist nur sehr wenig Literatur über Aminopeptidasen der Hefe erschienen.

Im Gegensatz zu den Hefeproteasen, die sehr eingehend untersucht wurden, waren die Hefe-Aminopeptidasen fast immer nur von sekundärem Interesse. So erwähnte CORDONNIER (62) die Aminopeptidase, die er bei der Isolierung der Dipeptidase fand, nur am Rande. Eine nähere Charakterisierung des Enzyms nahm er nicht vor. Auch die von TJEDER (52) beschriebene Aminopeptidase aus Bäckerhefe, die er "Naphthylamidase" nannte, wurde später nicht mehr erwähnt. Dieses Enzym konnte ebenfalls nicht in einheitlicher Form erhalten werden, die Be-

schreibung seiner Eigenschaften ist wenig ausführlich.

MATILE (46,47), der sich zwischen 1967 und 1971 mit den Hefe-Aminopeptidasen beschäftigte, hatte weniger Interesse an der Trennung der von ihm gefundenen Enzyme als an der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Aminopeptidasegehalt der Hefezelle und Zellcyclus. Eine weitergehende Anreicherung oder gar Charakterisierung der Enzyme wurde von ihm nicht versucht.

Erst 1975 berichtete MASUDA (7) von 2 Aminopeptidasen aus Hefe, die er elektrophoretisch einheitlich erhielt. Das größere der beiden Enzyme hat ein Molekulargewicht von 200000 daltons. MASUDA nannte es Aminopeptidase I. Vom Molekulargewicht her gesehen scheint dieses Enzym das gleiche zu sein wie die von uns teilweise gereinigte Aminopeptidase II. Ein Vergleich der Substratspezifitäten unter den von MASUDA angegebenen Bedingungen konnte leider nicht durchgeführt werden, da die von ihm verwendeten Substrate nicht zur Verfügung standen.

Während also in den letzten 30 Jahren wenig Arbeiten über Aminopeptidasen der Hefe erschienen, beschäftigten sich gegen Ende der zwanziger und im Verlauf der dreißiger Jahre GRASSMANN und Mitarbeiter (8-12,16), SCHNEIDER (17-20) und JOHNSON (1) mit diesen Enzymen. GRASSMANN isolierte seinen Angaben zu Folge eine Aminopeptidase aus Hefe, die er gegenüber dem Autolysat 1000-fach anreicherte. Dieses Enzym spaltet Tetrapeptide (in 2 Dipeptide), Tripeptide und Dipeptidester sowie Dipeptidamide, aber keine Dipeptide. Unter den von GRASSMANN angewendeten Versuchsbedingungen hydrolysiert dieses Enzym Ala-Gly-Gly besser als Leu-Gly-Gly und dieses wiederum

besser als Gly-Gly-Gly. Leu-Gly-Gly wird 500 mal schneller gespalten als Leu-Gly. Die Enzymaktivität wurde von GRASS - MANN bestimmt, indem er die bei der Freisetzung von Aminosäuren freiwerdende Carboxylgruppe mit KOH titrierte.

Das pH-Optimum des Enzyms bei der Spaltung von Ala-Gly-Gly fand er zwischen pH 6,7 und 7,0.

Entgegen den ersten Angaben fanden GRASSMANN (59) und SCHNEIDER (17-20) später, daß das Enzym auch Dipeptide zu spalten vermochte. Diese Dipeptidaseaktivität trat aber erst auf, wenn dem Testansatz Chloridionen oder "Hefekochsaft" zugefügt wurde.

Über die Reinheit der damaligen Enzympräparationen ist nichts bekannt, da ja zu jener Zeit Elektrophoresen noch unbekannt waren. Rechnet man aber die Aktivitäten um, so ergibt sich für seine besten Präparationen eine spezifische Aktivität von etwa 180 U/mg Protein.

Eine nach seinen Angaben einheitliche Aminopeptidase isolierte 1941 JOHNSON (1) aus Hefe. Auch er hat das Enzym gegenüber dem Autolysat 1000-fach angereichert. Diese Aminopeptidase hat ein Molekulargewicht von 670 000 daltons.

Obwohl Präparationen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten verwendet wurden, weist das Enzym in allen Fällen ein einheitliches Sedimentationsverhalten auf. Auch zur Elektrophorese verwendete JOHNSON Enzympräparationen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten, fand jedoch immer nur eine Proteinbande. Diese zwei Punkte, Einheitlichkeit bei der Sedimentation und in der Elektrophorese bei Enzymproben mit spezifischen Aktivitäten, die sich fast um das Doppelte unter-

scheiden, lassen zunächst vermuten, daß die zur Verfügung stehenden Methoden nicht ausreichten, um eine Trennung von aktivem und inaktivem Material zu erreichen.

Im Gegensatz zu GRASSMANN fand JOHNSON für die Spaltung von Ala-Gly-Gly ein Aktivitätsmaximum bei pH 7,2, für Leu-Gly-Gly ein Maximum bei pH 7,9. Das Enzym ist aktivierbar durch Zn^{2+} und Cl^- , in geringem Maße auch durch Co^{2+} .

Im Gegensatz zu GRASSMANNs Enzym spaltet JOHNSONs Aminopeptidase auch Dipeptide. Betrug bei GRASSMANN das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten von Leu-Gly-Gly zu Leu-Gly 500:1 und von Leu-Gly-Gly zu Gly-Gly-Gly 10:4, so war es bei JOHNSON 8:1 und 100:3. Die Tatsache, daß in Gegenwart von Cl^- auch GRASSMANNs Enzym Dipeptide spaltete, führte JOHNSON darauf zurück, daß GRASSMANNs Enzympräparation noch eine andere, durch Cl^- aktivierbare Peptidase enthielt.

Neben den bisher erwähnten unterschiedlichen Substratspezifitäten fand JOHNSON auch, daß das Enzym Leu-Gly-Gly besser spaltet als Ala-Gly-Gly, während bei GRASSMANN das Verhältnis umgekehrt war. JOHNSON mußte aus seinen Befunden, die in vielen Punkten anders waren als die von GRASSMANN, schließen, daß sein Enzym mit GRASSMANNs Aminopeptidase nicht identisch war.

In der bis heute existierenden referierenden Literatur sind diese zwei Enzyme auch immer getrennt aufgeführt, d.h., sie werden als zwei verschiedene Aminopeptidasen dargestellt (1-6). Sieht man jedoch von den unterschiedlichen Substratspezifitäten ab, die von den zwei Autoren angegeben werden, so weisen die beiden Enzyme wenigstens drei Gemeinsamkeiten auf:

- a) JOHNSON beschrieb für sein Enzym einen isoelektrischen Punkt von pH 4,5-4,8, GRASSMANN führte bei seiner Enzymisolierung eine isoelektrische Essigsäurefällung bei pH 4,5-4,7 durch.
- b) JOHNSON reinigte sein Enzym durch eine Folge von Acetonfällungen (30% v/v) bei pH 5,6-5,9, GRASSMANN führte als Abschluß seiner Enzymisolierung ebenfalls eine erfolgreiche Acetonfällung durch.
- c) Beide Enzyme lassen sich durch den Zusatz von Cl^- aktivieren.

Diese letzten drei Tatsachen lassen zumindest Zweifel auftreten an der in der Literatur vertretenen Meinung, daß hier zwei verschiedene Enzyme vorliegen. Vergleichende Studien mit beiden Enzymen müßten hier mehr Aufschluß bringen. Dies wurde schon von SMITH (4) vorgeschlagen.

Von uns wurden nun wenigstens vier verschiedene Aminopeptidasen im Hefeautolysat entdeckt, die aber in sehr unterschiedlichen Mengen auftreten. Die hier isolierte und näher untersuchte Aminopeptidase I weist im Dichtegradienten eine Sedimentationskonstante von etwa 20 S auf. JOHNSON fand für sein Enzym einen Wert von 21,3 S. Die Diffusionskonstante betrug bei ihm $3,09 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Daraus berechnete er ein Molekulargewicht von 670 000 daltons, wobei er allerdings keine Angaben macht über den Wert des zur Berechnung des Molekulargewichtes benötigten spezifischen partiellen Volumens. Unter Berücksichtigung der Fehler, mit denen die Bestimmungen der obigen Konstanten behaftet sind, stimmen beide Werte, unsrer und JOHNSONS, gut überein.

Beide Enzyme sind sich auch in der Substratspezifität

tät sehr ähnlich und lassen sich zudem durch Zn^{2+} , Co^{2+} und Cl^- aktivieren.

Eine von JOHNSON durchgeführte Acetonfällung (30% v/v, bei pH 5,6-5,9) ist auch bei unserem Enzym erfolgreich. Zudem besteht eine Übereinstimmung im isoelektrischen Punkt. Alle diese Tatsachen deuten darauf hin, daß es sich um ein und dasselbe Enzym handelt.

Um zu erfahren, ob die von GRASSMANN beschriebene Aminopeptidase ein anderes Enzym ist, wurde von uns eine Enzympräparation nach den Angaben dieses Autors durchgeführt. Wie sich herausstellte, weisen beide Enzyme mit den getesteten Substraten die gleiche Substratspezifität auf. Bei der Aminosäureanalyse treten keine Unterschiede auf, das Enzym ist ebenfalls aktivierbar durch Zn^{2+} und Cl^- bzw. Br^- und der isoelektrische Punkt ist der gleiche. Bei der Rechromatographie an DEAE-Cellulose werden beide Enzyme bei der gleichen NaCl-Konzentration eluiert und bei der Gelfiltration an Separose 6B sind die Elutionsmuster identisch (Auftreten von Untereinheiten).

Wie sich also herausgestellt hat, sind die von GRASSMANN und JOHNSON beschriebenen Aminopeptidasen mit der von uns isolierten AP I identisch. Die von JOHNSON angeführte unterschiedliche Substratspezifität ist nicht zu hoch zu bewerten, da die Meßmethoden recht unempfindlich waren, und die Messungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. So enthielt JOHNSONS Aktivitätstest 0,1 M NaCl und 0,1 mM Zn^{2+} , GRASSMANNs aber nicht. Daher fand er auch keine Spaltung von Dipeptiden, die ohne Zn^{2+} und Cl^- so langsam verläuft, daß sie mit seiner Meßmethode nicht zu erfassen war.

Hinzu kommt, daß die Reinheit der zu jener Zeit verwendeten Peptide zu bezweifeln ist. So enthielten z.B. nach Aussagen von JOHNSON die Peptide Leu-Gly-Gly und Ala-Gly-Gly oft wechselnde Mengen Zn^{2+} und Cl^- - Ionen, die beide von der Synthese her stammen.

Für die gefundenen Unterschiede in der pH-Abhängigkeit gilt ähnliches. Da wie bewiesen bei verschiedenen pH-Werten der Grad der Aktivierung unterschiedlich ist, sind die Darstellungen der pH-Abhängigkeiten des Enzyms von GRASSMANN und JOHNSON wertlos und nicht miteinander zu vergleichen.

5.2. Enzymisolierungen

Die Tatsache, daß zur Gewinnung der Aminopeptidase I aus Hefe die Hefezellen aufgeschlossen werden müssen und eine Autolyse notwendig ist, beweist, daß das Enzym ein intrazelluläres ist. Extrazelluläre Aminopeptidasen sind auch bisher nicht bekannt.

Da das Enzym zunächst als Nebenprodukt einer Dipeptidasepräparation erhalten wurde und für die Dipeptidase eine Autolysedauer von 16-20 h optimal ist, sind bei den ersten Enzympräparationen die Autolysen nach dieser Zeit unterbrochen worden. Später hat es sich herausgestellt, daß für die AP I eine Autolysedauer von 64-72 h wesentlich besser ist, da nach dieser Zeit etwa 3 mal so viel Enzym freigesetzt wird wie nach 20 h. Noch längere Autolysen sind bisher nicht versucht worden, da die Gefahr, daß das Enzym von den Proteasen der Hefe angegriffen wird, zu groß erscheint im Vergleich zu den nach diesen Autolysezeiten erzielten Aminopeptidaseaktivitäten. Wie JOHNSON (1) berichtete, ist das Autolyseverhalten ver-

schiedener Hefetypen recht unterschiedlich. Bei dem Hefetyp, mit dem er die besten Enzymausbeuten erhielt, beendete er die Autolysen nach 3-5 Tagen.

Bei der von uns verwendeten Bierhefe der MARBURGER BRAUEREI sind die Enzymausbeuten nach 64-72 h Autolyse ziemlich konstant und reproduzierbar. Lediglich in zwei Fällen konnte man eine nur sehr geringe Aminopeptidaseaktivität nachweisen. Das Autolysat wurde dennoch nicht verworfen und Enzympräparationen gemäß 3.1. durchgeführt. Wie sich im abschließenden Schritt, der Gelfiltration mit Sepharose 6 B erwies, war der Gehalt der Hefe an Aminopeptidase I nicht geringer als sonst. Die geringe Ausbeute an Aminopeptidaseaktivität war nur auf eine andere Verteilung der Untereinheiten zurückzuführen: Während normalerweise ein großer Teil des Enzyms in der aktiven Form mit einem Molekulargewicht von 600 000 daltons vorliegt, lag in diesen zwei Fällen das Enzym mehr in den inaktiven höhermolekularen Aggregaten und niedermolekularen Untereinheiten vor. Leider konnte bisher kein Verfahren gefunden werden, um das inaktive Enzym in reproduzierbarer Weise in größerem Maße in aktives zu überführen. Der einzige Unterschied zu den anderen durchgeführten Enzympräparationen war, daß die Hefe nicht wie normalerweise vor der Autolyse eingefroren war und langsam aufgetaut wurde, sondern nur über Nacht bei 4°C aufbewahrt worden war. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von JOHNSON (1) gemacht, der seine Hefe vor der Autolyse mehrere Monate gefroren aufbewahrte und dann damit die bessere Enzymausbeute (hohe spezifische Aktivität) erzielte als ohne diese Behandlung.

Da in den durchgeführten 22 Präparationen die Enzymausbeuten bei der Autolyse bis auf die zwei erwähnten Fälle immer recht hoch waren, wurden bisher keine anderen Autolysebedingungen (anderer pH, anderes Volumen, andere Temperatur) versucht.

Die der Autolyse nachfolgenden Schritte, Ammoniumsulfat- und Hitzefällung sind problemlos.

Die Anreicherung des Enzyms bei der Gelfiltration an Sephadex G-150 ist wegen des hohen Molekulargewichtes des Enzyms ungewöhnlich groß. Eine ähnliche Anreicherung bei vergleichbaren Enzymen wurde in der Literatur bisher noch nicht berichtet. Bei diesem Schritt ist noch zu erwähnen, daß natürlich die kleineren inaktiven Untereinheiten des Enzyms verlorengehen.

Obwohl die Acetonfällung nach der Gelfiltration keine Erhöhung der spezifischen Aktivitäten zur Folge hat, ist dieser Schritt doch sehr empfehlenswert, da dadurch das Volumen der auf die DEAE-Cellulose aufzutragenden Enzymlösung stark vermindert und die Enzymausbeute bei der Säulenchromatographie stark erhöht wird.

Bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose kann man durchschnittlich eine etwa 4-fache Anreicherung des Enzyms erzielen, dessen spezifische Aktivitäten bereits nach diesem Reinigungsschritt zwischen 100 und 200 U/mg Protein betragen. Die Schwankungen in den spezifischen Aktivitäten sind jedoch nicht auf einen wechselnden Anteil an Fremdprotein zurückzuführen, sondern auf den von Präparation zu Präparation verschiedenen hohen Gehalt der Enzympräparationen an aktivem Enzym vom Molekulargewicht 600 000 daltons.

Bei der Rechromatographie an DEAE-Cellulose wird die AP I von dem noch vorhandenen Fremdprotein befreit, das aber keine Peptidaseaktivität aufweist. Bei diesem Reinigungsschritt wird das Enzym nochmals 2,5-fach angereichert. Die hierbei erreichten spezifischen Aktivitäten schwanken in Extremfällen zwischen 250-450 U/mg, was wiederum auf den wechselnden Gehalt an aktivem Enzym zurückzuführen ist.

Für kinetische Messungen reicht die nach diesem Schritt erzielte Reinheit des Enzyms aus, normalerweise ist hierzu sogar die Reinheit der AP I nach der ersten Chromatographie an DEAE-Cellulose ausreichend, da ja keine störende Peptidaseaktivität mehr vorliegt. Will man nur kinetische Messungen und keine Untersuchungen zur Struktur der Untereinheiten des Enzyms durchführen, so ist es angebracht, keine Rechromatographie an DEAE-Cellulose, sondern nach der Acetonfällung der AP I die Enzymlösung auf eine NaCl-Konzentration von 80 mM zu bringen und die erste Chromatographie an DEAE-Cellulose bei dieser Salzkonzentration durchzuführen, obwohl die hierbei erzielten spezifischen Aktivitäten nicht ganz so hoch sind wie nach erfolgter Chromatographie und Rechromatographie.

Eine Abtrennung des aktiven Enzyms von inaktiven höheren Aggregaten und inaktiven Protomeren kann man bei der Gelfiltration mit Sepharose 6B erreichen. Dieses Material hat sich hierzu gegenüber anderen bezüglich Trennwirkung und Handhabung am besten bewährt.

Wie bereits erwähnt, ist die bei der Gelfiltration an Sepharose 6B zutage tretende Verteilung der Untereinheiten des Enzyms von Präparation zu Präparation ein wenig verschieden.

Jedoch ist nur in zwei Fällen sehr wenig aktives Enzym gegenüber einem großen Anteil inaktivem gefunden worden. Bisher ist noch keine Methode bekannt durch die man das letztere vollständig in die aktive Form mit dem Molekulargewicht 6×10^5 daltons überführen kann, was natürlich sehr wünschenswert wäre, da ja sonst ein großer Teil bei der Präparation gewonnenes Enzym für kinetische Experimente nicht verwendet werden kann. Lediglich durch Konzentrierung des inaktiven Proteins ist es möglich, dieses teilweise in aktives Enzym zu überführen (siehe Dichtegradientenzentrifugation).

Da das Enzym in so vielen Untereinheiten existiert und sich diese ineinander umwandeln können, andererseits jedoch nur die 600 000-Form aktiv ist, sind die in Tabelle III-V angegebenen Daten zur Anreicherung des Enzyms nur Näherungswerte, obwohl bei keiner Präparation zwischen den einzelnen Reinigungsschritten "Aktivitätssprünge" beobachtet werden konnten, was bedeutet, daß, wenn schon im Autolysat wenig aktives Enzym vorliegt auch bei der abschließenden Gelfiltration an Sepharose wenig erhalten wird. Das gleiche gilt auch für den umgekehrten Fall: Wenn schon das Autolysat eine hohe Amino-peptidaseaktivität aufweist, erhält man im Endeffekt auch viel aktives Enzym.

Besteht an der Isolierung der Dipeptidase kein Interesse, so ist die Aufarbeitung des Enzyms vorzuziehen, die in den ersten Schritten den von GRASSMANN beschriebenen Methoden folgt.

Bei der Autolyse unter Zusatz von Papain wird die Amino-peptidase I viel schneller freigesetzt, als wenn diese nur durch die hefeeigenen Proteasen erfolgt.

Ein Nachteil und gleichzeitig ein Vorteil dieser Aufarbeitungsmethode ist die Essigsäurefällung bei pH 4,5-4,7, die leider nicht immer erfolgreich ist, wovon auch schon GRASSMANN berichtete. Er erhielt bei diesem Reinigungsschritt Enzymausbeuten zwischen 32 und 94%, die in etwa mit unseren Erfahrungen übereinstimmen. Manchmal fällt das Enzym in großen Flocken aus, die sich sehr gut zentrifugieren lassen, manchmal jedoch auch ziemlich schleimig und schlecht zentrifugier-

bar. Auf jeden Fall darf man nicht sogleich das ganze Autolysat der Essigsäurefällung unterwerfen, sondern muß erst mit einem kleinen Teil eine Probefällung durchführen. Ist die Essigsäurefällung nicht erfolgreich, so empfiehlt sich die Aufarbeitung des Enzyms nach 3.1..

Bei einer erfolgreichen Durchführung der Essigsäurefällung wird das Enzym etwa 15-fach angereichert, bei der nachfolgenden Natriumacetat-Fällung, durch die hauptsächlich Nucleinsäuren abgetrennt werden, nochmals etwa 3-fach. GRASSMANN erzielte bei diesem Schritt noch höhere Anreicherungen (etwa 10-fach).

Schon nach der Dialyse der Na-Acetate-Fällung will GRASSMANN sein Enzym etwa 1000-fach angereichert haben. Dies konnte von uns nicht bestätigt werden, denn durch eine nachfolgende Acetonfällung, die von GRASSMANN zwar erwähnt wurde, deren methodische Durchführung er aber nicht beschrieb, ist nochmals eine beachtliche Erhöhung der spezifischen Aktivität zu erreichen.

Auch nach der Acetonfällung ist das Enzym noch von sehr viel Fremdprotein begleitet, was bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose deutlich wird, bei der das Fremdprotein, das keine Petidaseaktivität zeigt, sehr gut abgetrennt werden kann. Bei der abschließenden Gelfiltration kann man statt Sephadex G-200 auch Separose 6B verwenden.

Die von GRASSMANN beschriebene und von uns weiter entwickelte Methode zur Anreicherung der AP I aus Hefe hat gegenüber der von uns in 3.1. beschriebenen den Vorteil, daß die Isolierung schneller geht, jedoch den Nachteil der mit Problemen behafteten Essigsäurefällung, während die unter 3.1. beschriebenen Methoden alle problemlos sind. Die Enzymausbeuten sind bei beiden Aufarbeitungsmethoden etwa gleich groß, so daß es schwierig erscheint, welche Methode man vorziehen soll.

Der von JOHNSON beschriebene Aufarbeitungsgang, der in einer Reihe von Acetonfällungen besteht, führte bei uns nicht zum Erfolg. Wie der Autor selbst schreibt, sind die optimalen Bedingungen zur Durchführung der Acetonfällungen von Enzympräparation zu Enzympräparation unterschiedlich, wobei er

noch erwähnt, daß öfters noch weitere Acetonfällungen nötig sind, um die in seinem als Beispiel einer Enzymisolierung angeführten spezifischen Aktivitäten zu erreichen. Wie er auch berichtet, ist manchmal die Durchführung einer Ammoniumsulfat-Fällung vorteilhafter als eine Acetonfällung.

Da diese Aufarbeitungsmethode nicht reproduzierbar erscheint, ist von ihr abzuraten, obwohl JOHNSON das Enzym in hohen Ausbeuten (ca.50%) erhielt mit spezifischen Aktivitäten, die mit den von uns erhaltenen vergleichbar sind.

Die von uns durchgeführte teilweise Reinigung der Amino-peptidase II wurde noch unternommen, um zu prüfen, ob es sich nicht etwa um eine Untereinheit der AP I handelt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die AP II zeigt eine ganz andere Substratspezifität und elektrophoretisches Verhalten als die AP I und deren Untereinheiten. Das Enzym scheint dem von MASUDA und Mitarbeitern (7) beschriebenen und Amino-peptidase I genannten Protein recht ähnlich zu sein. Genauere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Enzyms stehen jedoch noch aus.

5.3. Zuckergehalt des Enzyms

Die Amino-peptidase I aus Hefe ist ein Glykoprotein mit einem Zuckeranteil von etwa 12%. In der Literatur sind eine ganze Reihe von Peptidasen beschrieben, die ebenfalls Glykoproteine darstellen. So enthält die Carboxypeptidase Y 15% Kohlenhydrate, die Proteinase A weist einen Hexosenanteil von 9,7% auf (siehe Tabelle I). Auch die partikelgebundene Amino-peptidase M aus Schweinenieren hat mit 20% einen ziemlich hohen Kohlenhydratanteil, ähnlich wie das entsprechende Enzym aus Darmschleimhaut vom Schwein (siehe Tabelle II) mit 23%.

Wie bereits erwähnt, ist der von uns angegebene Wert für den Hexosenanteil des Enzyms nur ein Näherungswert, der nach oben oder unten abweichen kann (siehe Ergebnisse).

Neben der Fehlerquelle, die auf das Nichtkennen der tatsächlich an das Enzym gebundenen Neutralzucker zurückzuführen ist, ist noch zu bedenken, daß alle Zuckerbestimmungen mit der gleichen Enzympräparation durchgeführt wurden. Da das Enzym ziemlich lange der Autolyse ausgesetzt war, ist es natürlich möglich, daß während der Autolyse schon ein Teil Kohlehydrat enzymatisch vom Protein entfernt worden ist. Um zu erfahren, ob dies der Fall ist, müßte man Enzympräparationen mit unterschiedlichen Autolysedauern durchführen und jeweils erneut den Gesamtkohlenhydratanteil der verschiedenen Präparationen bestimmen.

Ob es überhaupt möglich ist, den Zucker aus dem Enzym enzymatisch zu entfernen, wurde bisher nicht untersucht. Daher kann auch keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Kohlenhydratanteil der AP I essentiell ist, d.h., ob nach der Abspaltung des Zuckers das Protein noch enzymatisch aktiv ist. Ebenfalls noch nicht untersucht wurde die Kohlenhydratverteilung in sämtlichen existierenden Formen des Enzyms.

5.4. Molekulargewicht und Untereinheiten der AP I

Die Amino-peptidase I aus Bierhefe ist wie gesehen ein sehr komplexes Enzym, das aus vielen Untereinheiten besteht, wobei die Verteilung der Protomeren, des aktiven Oligomeren und der höhermolekularen Aggregate pH-abhängig ist. Das gleiche gilt für die Geschwindigkeiten der Gleichgewichtseinstellungen zwischen den verschiedenen Formen des Enzyms.

Mit den aus den Dichtegradientenzentrifugationen erhaltenen Sedimentationskonstanten lassen sich die Molekulargewichte der verschiedenen Untereinheiten zunächst nur näherungsweise bestimmen, da das Sedimentationsverhalten eines Proteins stark von dessen geometrischer Gestalt abhängig ist. Lediglich für das aktive Enzym ist das Molekulargewicht mit Hilfe des erhaltenen Sedimentationskoeffizienten, der von JOHNSON bestimmten Diffusionskonstanten und dem aus der Aminosäureanalyse und dem Zuckergehalt des Enzyms berechneten

partiellen spezifischen Volumen nach der SVEDBERG-Gleichung zu berechnen, wobei Werte zwischen 580 000 und 600 000 daltons erhalten wurden.

Bei der SDS-Elektrophorese des Enzyms ist der Hauptproteinbande ein Molekulargewicht von $51\,000 \pm 2\,000$ daltons zuzuordnen. Je nach der Inkubationsdauer mit SDS findet man jedoch auch mehr oder weniger große Peaks mit dem doppelten Molekulargewicht. Dies spricht dafür, daß das aktive Enzym aus 12 Untereinheiten besteht, deren Molmasse je 50 000 daltons ist, woraus sich für das Oligomere ein Molekulargewicht von 600 000 daltons ergibt.

Vergleichbar mit der AP I hinsichtlich Größe und Zusammensetzung der Untereinheiten ist die GLUTAMIN-SYNTHEASE aus E.coli (170) mit einem Molekulargewicht von ebenfalls 600 000 daltons, die auch aus 12 Untereinheiten mit Molmassen von jeweils 50 000 daltons besteht. Mit 20,3 S ist die Sedimentationskonstante dieses Enzyms von der gleichen Größenordnung wie die der AP I mit einem mittleren Wert von 20,1 S.

Eine andere Aminopeptidase mit einem so hohen Molekulargewicht wie es die AP I zeigt, ist bisher noch nicht bekannt. Das größte bisher berichtete Molekulargewicht einer Aminopeptidase beträgt 4×10^5 daltons (siehe Tabelle II).

Der bei alkalischen pH-Werten in den Dichtegradientenzentrifugationen gefundene ebenfalls aktive Peak mit 16,3 S ist möglicherweise auf eine Konformationsänderung des aktiven Enzyms mit 20 S zurückzuführen, was auch eine Änderung des Sedimentationsverhaltens bewirken könnte. Andererseits ist es natürlich auch denkbar, daß bei alkalischem pH aus der 600 000-Form des Enzyms einige Untereinheiten herausgelöst werden und die dann so entstandene Form ebenfalls aktiv ist. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist bisher noch nicht zu treffen.

Dem bei den Dichtegradientenzentrifugationen sowohl im sauren als auch im alkalischen pH-Bereich auftretendem Peak mit $3,5 \pm 0,5$ S muß man ein Molekulargewicht von 50 000 daltons zuordnen, wenn man die bei der SDS-Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt. So hat z.B. Rinderserumalbumin mit

einer Sedimentationskonstante von 4,2 S ein Molekulargewicht von 69 000, Zn- α_2 -Glykoprotein mit 3,2 S eines von 41 000 daltons (166).

Das Maximum dieses Peaks erscheint bei der Gelfiltration an Sepharose 6B (Abb.26 a,b) bei der Fraktionsnummer 86. Aus diesem Experiment wird deutlich, daß das MG dieser Untereinheit kleiner sein muß als 64 000, da Hämoglobin schon vorher von der Säule eluiert wird ($M_{\text{Häm}}$ bei Fr.-Nr.75). Aus dem Proteinverlauf in Abb.26 a und c ist auch ersichtlich, daß dieser Peak nicht einheitlich ist und man vermuten muß, daß noch Untereinheiten mit kleineren Molekulargewichten existent sind. Allerdings treten diese nur in kleineren Mengen auf als das 50 000-Protomer.

Unter drastischen Bedingungen, z.B. bei der Elektrophorese in SDS, treten ebenfalls noch kleinere Untereinheiten auf. Man findet hierbei auch Proteinpeaks, denen Molekulargewichte von $38\,000 \pm 3\,000$ und $26\,000 \pm 3\,000$ daltons zuzuordnen sind. Bei den Dichtegradientenzentrifugationen von succinylierter AP I und von Enzym, das in Gegenwart von SDS mit Fluo-resceinisothiocyanat behandelt wurde, findet man jeweils Peaks mit einer Sedimentationskonstante von ca. 2S, die mit der von Ribonuclease (MG 13 500 daltons) übereinstimmt. Während bisher bei der Aminosäureanalyse unter Berücksichtigung des Zuckeranteils ein minimales Molekulargewicht von 22 000 daltons für die AP I gefunden wurde, scheinen neuere Analysen daraufhinzuweisen, daß dieser Wert korrigiert werden muß. Dies ist auf die Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Tryptophan-Wertes zurückzuführen, da Trp unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse teilweise zerstört wird und damit ein zu niedriger Trp-Gehalt gefunden wird. Hinzu kommt, daß das Enzym nur wenig Trp enthält. Neue genauere Trp-Analysen weisen daraufhin, daß das Enzym nicht wie angegeben (siehe Tabelle VI) zwei, sondern drei Tryptophane pro 22 Phenylalanine aufweist. Mit diesem neuen Wert erhält man ein minimales Molekulargewicht von ca. 16 000 bis 17 000 daltons. Diese Proteinspezies könnte mit der in der Dichtegradientenzentrifugation gefundenen 2S-Untereinheit identisch sein. Falls dieser Wert stimmt, was noch genauer untersucht werden

muß, besteht das Protomer mit einem MG von 50 000 daltons nochmals aus drei Proteinketten, die aber ziemlich fest aneinander gebunden sein müßten, da man unter weniger drastischen Bedingungen größtenteils dieses Protomer findet. Wegen der festen Bindungen der kleinsten Untereinheiten ist anzunehmen, daß die "Grundeinheit" des Enzyms durch die 50 000-Untereinheit gebildet wird.

Bei der SDS-Elektrophorese tritt auch ein Peak mit einem Molekulargewicht von 10^5 daltons auf. Dies würde dann der dimeren Form entsprechen.

Der bei der Dichtegradientenzentrifugation gefundene Peak mit 8,2 S hätte dann ein MG von 2×10^5 daltons, was der tetrameren Form entsprechen würde. Auch bei der Gelfiltration mit Sepharose 6B tritt kurz nach dem Erscheinen der Katalase (MG 240 000) ein inaktiver Peak auf, dem dieses Molekulargewicht zuzuschreiben wäre (Abb.26 a-d, siehe besonders d).

Bei den Dichtegradientenzentrifugationen findet man auch einen Proteinpeak mit 12 S. Dies ist wahrscheinlich das Hexamer der 3,5S-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 300 000 daltons (MG von Katalase 240 000 daltons mit 11,3 S). Auch bei der Gelfiltration an Sepharose 6B (Abb. 26) findet man einen Peak bei Fraktionsnummer 48, der kurz vor dem Molekülpeak der Katalase erscheint.

Bemerkenswert ist, daß das Hexamer bei den Dichtegradientenzentrifugationen im Vergleich zu den Gelfiltrationen in so geringer Menge auftritt. Eine Erklärung hierfür bietet die Proteinkonzentration, die bei den Sepharoseläufen wesentlich niedriger waren als bei den Versuchen zu den Dichtegradientenzentrifugationen.

Wie die Bildung von aktivem Enzym und anderen Protomeren aus der Untereinheit mit einem MG von 50 000 daltons bei deren Konzentrierung beweist, ist die Verteilung der Untereinheiten des Enzyms konzentrationsabhängig (vergleiche Abb.26 a mit 26 b und 27 b). Läßt man die Fraktionen 77 bis 95 aus dem Lauf a (Abb. 26 a) längere Zeit unverändert stehen, so ist kein Aktivitätszuwachs zu verzeichnen.

Auch die höhermolekularen Aggregate, von denen es mehrere mit unterschiedlichen Molekulargewichten gibt (Abb.28), bilden beim Einengen wieder aktives Enzym und die kleineren Untereinheiten (vergleiche Abb.26 a und d). Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten und der Molekulargewichte dieser Aggregate sind bisher noch nicht erfolgt. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb.31) kann man jedoch entnehmen, daß sich die aktive 600 000-Form des Enzyms zu Zweier- und Dreiergruppen zusammenlagert. Dementsprechend müßten diese höhermolekularen Spezies des Enzyms Molekulargewichte von 1,2 und $1,8 \times 10^6$ daltons aufweisen.

Wegen der Einflüsse von pH und Proteinkonzentration auf die Verteilung von Oligomer und der Protomere ist es schwierig, die Eigenschaften der einzelnen Enzymformen zu untersuchen.

Zu ihrer Trennung muß man zunächst eine Gelfiltration mit Sepharose 6B (wenn man eine relative gute Trennung aller Spezies erhalten will), oder mit anderen Molekularsieben durchführen (z.B. optimale Abtrennung der höhermolekularen Aggregate von den anderen Enzymformen mit Sepharose 4B, wobei die letzteren aber kaum getrennt werden).

Eine präparative Elektrophorese hat wegen der geringen elektrophoretischen Beweglichkeit des aktiven Enzyms und dessen Dimeren und Trimeren, wenig Sinn.

Will man dann mit den einzelnen Spezies weitergehende Untersuchungen durchführen, so ist man gezwungen, das Enzym zu konzentrieren, wobei aber wieder eine Umwandlung bewirkt würde.

In der Literatur findet man Beispiele von Aminopeptidasen, die entweder aus identischen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind (siehe Tabelle II). Ein Beispiel für eine Aminopeptidase, die zwei verschiedene Untereinheiten aufweist, ist das Enzym aus *Bacillus Stearothermophilus* (118-122). Das Verhältnis der Untereinheiten α und β kann im aktiven Enzym unterschiedlich sein, was verschiedene Substratspezifitäten der einzelnen Spezies zur Folge hat.

Ob die Aminopeptidase I aus verschiedenen oder gleichen Untereinheiten aufgebaut ist, läßt sich hier noch nicht sagen, da eine versuchte Endgruppenbestimmung mit Carboxypeptidase A keinen Erfolg zeigte. Eine Bestimmung der aminoendständigen Aminosäuren des Enzyms wurde bisher noch nicht versucht.

5.5. Stabilität des Enzyms

Die Aminopeptidase I ist im Vergleich zu vielen anderen bekannten Enzymen sehr stabil, wobei ihre Stabilität eine Funktion des pH ist. Dies wurde schon von JOHNSON (1) festgestellt, der verdünnte Enzymlösungen 3 h bei verschiedenen pH-Werten bei 22°C aufbewahrte (in Gegenwart von 10 mM NaCl) und dabei eine maximale Enzymstabilität zwischen pH 9 und 10 fand.

Wie wir durch die Dichtegradientenzentrifugationen feststellen konnten, beruht diese pH-Abhängigkeit auf der Dissoziation des aktiven Enzyms in seine inaktiven Protomere, wobei das Dissoziationsgleichgewicht bei den einzelnen pH-Werten unterschiedlich ist und zudem noch von den Aktivatoren Zn^{2+} und Br^- beeinflusst wird. Inkubiert man Enzymproben bei pH 10 mit und ohne Zink und Bromid, so ist nach 2 Wochen in der Lösung ohne Aktivatoren kein aktives Enzym mehr vorhanden, während sich die Aktivität in deren Gegenwart nicht wesentlich geändert hat. Dies wird auch ersichtlich aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der so behandelten Proben. Durch Aktivatoren geschütztes Protein zeigt einen großen Anteil an nativem Enzym, während im anderen Falle nur noch kleine Bruchstücke zu sehen sind.

EDTA-behandeltes nur essentielles Zn^{2+} enthaltendes Enzym weist eine maximale Stabilität zwischen pH 6 und 7 auf und ist im saueren als auch im alkalischeren pH-Bereich rasch in die inaktiven Untereinheiten zerfallen. Dieser Zerfall wird durch Zink und Bromid zwischen pH 5 und 11 nicht nur verlangsamt, es kann sogar eine geringfügige Aktivierung beobachtet werden. Der effektivste Schutz vor Inaktivierung wird hier in Gegenwart von Zn^{2+} und Br^- gewährleistet, während

Br^- allein keinen so guten Schutz bietet. Der Einfluß von Zn^{2+} allein wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Die in unseren Experimenten erhaltenen Ergebnisse können bisher auch noch kein vollständiges Bild ergeben. Hierzu müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden. So bedarf die Zeitabhängigkeit der Enzyminaktivierung noch einer genauen Untersuchung unter verschiedenen Bedingungen. Die Temperaturabhängigkeit, der Einfluß der Konzentrationen der Aktivatoren, von Puffern und von Enzym ist bisher noch nicht bekannt.

Da zwischen pH 6 und 6,5 die Konzentrationen der inaktiven Untereinheiten im Vergleich zu denen des aktiven Enzyms gering sind, wurde bei den obigen Experimenten Enzym von pH 6,0 auf die entsprechenden pH-Werte gebracht, wobei die Aktivitätsmessungen nach einer kurzen Vorinkubation der Enzymproben im Testpuffer bei pH 7,8 in Gegenwart von Zink und Chlorid erfolgten. Dies ist zur Vermeidung von lag-Phasen notwendig. Inkubiert man etwa 1-2 Minuten bei 40°C vor, so treten keine lag-Phasen mehr auf, eine längere Vorinkubation (bis zu 30 Minuten) ändert die Anfangsgeschwindigkeiten der Peptidhydrolasen nicht meßbar. Wegen der lag-Phase sind die ohne Vorinkubation erhaltenen Geschwindigkeiten nicht ohne größeren mathematischen Aufwand miteinander zu vergleichen. Es kann daher nicht gesagt werden, ob während dieser kurzen Vorinkubation nicht schon wieder eine Beeinflussung der Konzentration an aktivem Enzym stattfindet, die dann aber sehr schnell erfolgen müßte. Hinweise auf eine solche Umwandlung wären durch Aktivitätsmessungen bei verschiedenen pH-Werten zu erhalten, da die Aktivität der einzelnen Proben im Falle einer schnellen Konzentrationsänderung des aktiven Enzyms bei den einzelnen pH-Werten in verschiedenen Verhältnissen zueinander stehen müßten, man sollte also, wenn man z.B. die Aktivitäten aller Proben bei pH 7,8 und pH 6,0 mißt, unterschiedliche Verhältnisse in der Enzymaktivität feststellen können. Dies wäre jedoch nur dann der Fall, wenn die schnelle Umwandlung der Untereinheiten pH-abhängig ist. Führt man das Experiment aber so durch, daß man die Enzymaktivitäten in dem Puffer mißt, in welchem das Enzym bei 4°C

stehengelassen wurde, so ist dies wegen der geringen Aktivität des Enzyms in Abwesenheit der Aktivatoren und der hohen, die es in deren Gegenwart zeigt, schlecht möglich, da man im letzteren Fall bei Enzymkonzentrationen, die auch ohne Aktivatorzusatz bei allen pH-Werten meßbare Aktivitäten ergeben, mit Zink und Bromid zu so hohen Geschwindigkeiten gelangt, daß echte Anfangsgeschwindigkeiten kaum noch zu bestimmen sind. Hinzu kommt, daß bei der Bestimmung der Aktivitäten in Puffern von pH-Werten - 5 und - 10 solche kaum noch festzustellen sind, da das Enzym hier nur sehr wenig aktiv ist.

Aus diesem Grunde konnte die Hitzestabilität des Enzyms, bei der die Aktivitätsmessungen in den gleichen Puffern erfolgten, in denen auch das Enzym der Hitzebehandlung unterzogen wurde, auch nur zwischen pH 5,0 und 9,0 bestimmt werden. Unterhalb von pH 5,0 ergeben sich auch schon Schwierigkeiten mit der Löslichkeit des Enzyms, das ja bei pH 4,7 seinen isoelektrischen Punkt aufweist.

Bei den Experimenten zur Hitzestabilität der AP I wurde ebenfalls EDTA-behandeltes Enzym von pH 6,0 mit den Puffern der jeweiligen pH-Werte verdünnt und über Nacht stehengelassen, wobei schon hier eine Umwandlung von aktivem Enzym in seine Untereinheiten stattgefunden hat, deren zeitlicher Verlauf wie gesagt abhängig ist vom pH und von den Aktivatorkonzentrationen. Die Konzentration des aktiven Enzyms war also schon vor der Ausführung des Experimentes bei den verschiedenen pH-Werten unterschiedlich, was hier wohl einen Fehler bewirkte, obwohl die Aktivitäten von hitzebehandeltem und unbehandeltem Enzym jeweils nebeneinander gemessen und zueinander in Beziehung gesetzt wurden.

Aus dem Verlauf der Restaktivitäten in Abhängigkeit vom pH kann geschlossen werden, daß Zn^{2+} und Cl^- bzw. Br^- unterschiedliche Mechanismen bei der Enzymaktivierung zeigen müssen, da Br^- allein kaum einen Einfluß auf die Hitzestabilität hat. Der Verlauf der Kurven läßt auch vermuten, daß das aktive Enzym bei den verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, da Zn^{2+} bei pH 6 einen maximalen Schutz bietet, der bei pH 8 wesentlich geringer ist, nach der alkalischen Seite aber wieder zunimmt. Hingegen

schützen Zink und Bromid zusammen bis pH 8,0, was darauf hindeutet, daß die beiden Aktivatoren in noch ungeklärter Weise miteinander kooperieren müssen. Inwieweit die Inaktivierung bei der Hitzebehandlung auf eine Denaturierung oder auf eine Umwandlung von aktivem Enzym in die inaktiven Protomere zurückzuführen ist, ist bislang noch nicht untersucht.

Bemerkenswert ist, daß das unter sonstigen Bedingungen so stabile Enzym bei der Gefriertrocknung etwa 40% seiner Aktivität verliert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß es unter diesen Bedingungen der Konzentrierung inaktive höhermolekulare Aggregate bildet.

5.6. Zink-Gehalt des Enzyms

Wie schon JOHNSON (1) 1941 berichtete, wird die AP I durch Co^{2+} und Zn^{2+} aktiviert. Dies konnte von uns bestätigt werden. Von einer Reihe getesteter zweiwertiger Metallionen sind nur Co^{2+} (in geringem Maße) und Zn^{2+} in der Lage, das Enzym nach Behandlung mit EDTA zu reaktivieren.

Bei der Bestimmung des Zink-Gehaltes des Enzyms wurde von uns gefunden, daß es $1,8 \pm 0,5$ Grammatome Zink pro Oligomer enthält. Dieser Wert läßt eine endgültige Entscheidung, ob von der aktiven Form des Enzyms mit dem Molekulargewicht von 600 000 daltons ein oder zwei g-Atome Zink gebunden werden, nicht zu.

Wie die Dichtegradientenzentrifugationen beweisen, liegt das Enzym bei pH 6,5 (bei pH 6,2 wurde die AP I zur Entfernung überschüssigen Zinks erschöpfend gegen Puffer dialysiert und bei pH 6,5 nach 2.3.3. mit EDTA behandelt) zum großen Teil in der aktiven Form vor, obwohl daneben auch noch die Untereinheiten existent sind. Kann das Metall nun nur von der aktiven Form gebunden werden, und nicht von den inaktiven Untereinheiten, so würde unter den Versuchsbedingungen auch das Metall entfernt, das von dem Enzym gebunden würde, läge es nur in der aktiven Form vor. Der von uns gefundene Wert ist also wahrscheinlich eher zu niedrig als zu hoch, d.h., es ist wahrscheinlicher, daß das Enzym 2 g-Atome Zink enthält pro Mol

und nicht nur eins.

Bemerkenswert ist die gute Übereinstimmung für die Werte des Zink-Gehaltes der AP I nach zwei verschiedenen Behandlungen. Sowohl nach erschöpfender Dialyse des Enzyms gegen zink-freien Puffer als auch nach EDTA-Behandlung und Entfernung des überschüssigen Chelators durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 erhält man den gleichen Wert. Das deutet daraufhin, daß dieses Zink von dem Enzym fest gebunden wird. Der durch Atomabsorptionsmessungen erhaltenen Zink-Gehalt des Enzyms steht in guter Übereinstimmung mit dem Experiment, in dem die Abhängigkeit der Aminopeptidaseaktivität von der Zink-Konzentration im Puffer untersucht wurde. Dabei wurde ja festgestellt, daß EDTA-behandeltes Enzym, wie es auch zur Zink-Bestimmung verwendet wurde, noch eine geringe Restaktivität besitzt, wobei diese Enzymlösung etwa $0,04 \mu\text{M Zn}^{2+}$ enthielt. Erst wenn die freie Zink-Konzentration im Testpuffer auf 10^{-10}M herabgesetzt wird, ist keine Aktivität mehr zu beobachten. Die Enzymkonzentration im Test war dabei von der gleichen Größenordnung, sie betrug etwa $1,5 \times 10^{-11}\text{Mol/l}$.

Sehr viele Peptidasen sind Zink-Metallenzyme, wobei der Zink-Gehalt recht unterschiedlich sein kann. Die Hefedipeptidase beispielsweise enthält 7 g-Atome Zink/130 000 g; die Leucin-aminopeptidase aus Schweinenieren 4-6 Mol essentielles Zink pro Mol aktivem Enzym. Hingegen weist das gleiche Enzym aus Rinderaugenlinsen 12 g-Atome Zink/300 000 g auf (Literatur: Siehe Tabelle I und II).

Enzyme, deren Zink-Gehalt pro aktiver Form des Proteins den von uns gefundenen entsprechen, sind die Aminopeptidasen M aus Schweinenieren und Darmschleimhaut des Schweines sowie die Alaninaminopeptidase aus menschlicher Leber, die 2 Mol Zink pro 280 000 g (Aminopeptidasen M) oder 240 000 g (Alaninaminopeptidase) enthalten (siehe Tabelle II).

5.7. Katalytische Eigenschaften des Enzyms

5.7.1. Einfluß von Effektoren auf die Amino-peptidaseaktivität

Metallchelatoren

Erwartungsgemäß wird die AP I als Metallenzym durch Metallchelatoren gehemmt, wobei EDTA am effektivsten ist. O-Phenanthrolin hemmt erst in 10-fach höheren Konzentrationen.

Ähnliche Verhältnisse findet man bei der Alaninamino-peptidase aus menschlicher Leber, die auch bei 1 μ M EDTA fast vollständig gehemmt wird, während o-Phenanthrolin hier sich erst in 1 mM Konzentrationen hemmend auf die Peptidaseaktivität auswirkt(114).

Die SH-Verbindungen Dimercaptopropanol-(1,3), Cystein und Dithioerythrit hemmen erst in einer Konzentration von 1 mM. Dies ist auf die aktuelle Konzentration der deprotonierten Formen $R-S^-$ zurückzuführen, von denen zu erwarten ist, daß sie Metalle besser komplexieren können als die protonierten $R-SH$, wobei bei dem pH unseres Experimentes die Konzentration von $R-S^-$ nur etwa 0,1% der Gesamtkonzentration ausmacht.

Unter den Versuchsbedingungen ist die Hemmung durch EDTA vollständig reversibel. Durch den Zusatz von Zink in entsprechenden Konzentrationen zu mit EDTA bei 40°C vorinkubiertem Enzym erhält man Aktivitäten, die mit der ursprünglichen vergleichbar sind.

Einfluß von Me^{2+} - und Halogenidionen auf die Amino-peptidaseaktivität

Wie schon vorher erwähnt, weist mit EDTA-behandeltes Enzym noch eine geringe Restaktivität auf, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß es fest gebundenes Zink enthält. Dies ergibt sich aus der quantitativen Zink-Bestimmung.

Eine Reihe gut untersuchter Metallenzyme besitzt ebenfalls fest gebundenes essentielles Zink im aktiven Zentrum und weniger fest gebundenes, das sich an einer anderen Stelle

des Enzyms befindet und die Enzymaktivität erhöht. Beispiele hierfür sind die alkalische Phosphatase aus Rinderniere (167), und die Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (97,99), bei der das lose gebundene Zink leicht durch Mn^{2+} oder Mg^{2+} ersetzt werden kann, woraus unterschiedliche spezifische Aktivitäten und Enzymstabilitäten resultieren.

Bei der Alaninaminopeptidase aus menschlicher Leber kann hier hingegen ein Austausch gegen Co^{2+} erfolgen, was eine etwa 2-fache Aktivitätserhöhung zur Folge hat (114).

Ein weiteres Beispiel für solch ein Enzym stellt die Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber dar, bei der sich auch das katalytische Zink gegen Cobalt austauschen läßt, was jedoch eine Inaktivierung des Enzyms bewirkt (168).

Auch bei der AP I treten mehrere Zink-Bindungsstellen im Enzym auf, was sich aus der Konzentrationsabhängigkeit der Peptidaseaktivität vom Zn^{2+} -Gehalt im Testpuffer ableiten läßt. Obwohl zur endgültigen Bestätigung dieses Punktes noch weitere Experimente notwendig sind, scheint die AP I doch fest gebundenes, katalytisches Zink zu enthalten und wie die oben erwähnten Enzyme in der Lage zu sein, durch die Bindung von weiterem Zn^{2+} seine Aktivität zu steigern.

Entfernt man durch Behandlung mit EDTA alle Zn^{2+} -Ionen bis auf die fest gebundenen aus dem Enzym, so ist es nur durch den Zusatz von Zn^{2+} wieder vollständig zu reaktivieren. Co^{2+} bewirkt nur eine sehr geringe Aktivierung, andere gesteste zweiwertige Metallionen wirken sich negativ auf die Peptidaseaktivität aus. Daraus kann man schließen, daß diese Metalle das essentielle Zn^{2+} im aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt haben, es in seiner katalytischen Funktion aber nicht zu ersetzen vermögen, oder aber die vorhandenen weiteren Zink-Bindungsstellen, die nach Behandlung des Enzyms mit EDTA vakant sind, besetzen, was ebenfalls zu einer Aktivitätserniedrigung führen kann. Eine Entscheidung darüber, welche Zn^{2+} -Bindungsstellen durch die anderen zweiwertigen Metallionen besetzt werden, ist mit den Ergebnissen der bisherigen Experimente nicht zu treffen. Auf jeden Fall lassen sie sich durch Erhöhung der Zink-Konzentration im Testpuffer mehr oder

weniger leicht wieder durch Zn^{2+} verdrängen, was durch die erfolgte Aktivitätserhöhung bei Zusatz von Zink bewiesen wurde.

Wie die kinetischen Experimente zeigen, bewirkt eine Zunahme der Zink-Konzentration eine Erhöhung von V_{Max} , während $K_{\text{M,app}}$ und der HILL-Koeffizient n_{H} nicht signifikant verändert werden. Dies läßt eine unabhängige Bindung von Aktivator und Substrat an das Protein vermuten (169).

Da Zn^{2+} die Substratbindung nicht beeinflußt, wohl aber die Hitzestabilität des Enzyms, ist zu vermuten, daß das aktivierende Metall eine strukturelle Funktion hat, also die Enzymkonformation verändert, ähnlich wie der "tightening"-Effekt von Mg^{2+} und Mn^{2+} bei der Glutamin-Synthetase aus E.coli, die nach EDTA-Behandlung in inaktiver "entspannter" Form vorliegt. Diese unterscheidet sich von der "gespannten" Form in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften. Auch dieses Enzym, das ein Molekulargewicht von 600.000 daltons und 12 Untereinheiten aufweist, besitzt mehrere Zink-Bindungsstellen, die sich in ihrer Affinität zum Metall unterscheiden (170,171).

Nicht nur durch den Zusatz von Zn^{2+} zu EDTA-behandeltem Enzym, sondern auch durch Cl^- und Br^- läßt sich die Amino-peptidase-aktivität weiter steigern, wobei man mit Zn^{2+} oder Br^- bzw. Cl^- in etwa gleiche Aktivitäten erreichen kann. Zur Aktivitätssteigerung mit Br^- benötigt man also nur das essentielle Zink im aktiven Zentrum des Enzyms. Wie die kinetischen Ergebnisse beweisen, wirkt Br^- im Gegensatz zu Zink als positiver allosterischer Effektor, indem es die normale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik wiederherstellt.

Ein ähnliches Phänomen tritt bei Cathepsin C auf, das ebenfalls durch Halogenidionen aktiviert wird, jedoch kein Metall-enzym ist. Auch hier findet man ohne Cl^- und bei sehr geringen Chloridkonzentrationen Kooperativität, die bei höheren Effetorkonzentrationen jedoch aufgehoben wird (141,142). Die unterschiedlichen Mechanismen, die Zn^{2+} und Br^- bei der Aktivierung der AP I zeigen, wurden oben schon angesprochen (siehe Diskussion: Stabilität des Enzyms).

Während die Aktivierung von Enzymen durch Metalle und Halogenidionen sehr oft vorkommt, ist bisher noch kein anderes

Metallenzym beschrieben worden, das gleichzeitig durch Metalle und einwertige Anionen aktiviert wird. Eine Aktivitätserhöhung durch Halogenidionen wurde zum ersten Mal von MYRÄCK (172) bei der α -Amylase beobachtet. Später wurden solche Aktivierungserscheinungen auch bei der Aminopeptidase B aus Rattenleber (133), bei der die Aktivierung durch Cl^- jedoch pH-unabhängig ist, und bei dem Cathepsin C (138, 139) gefunden. Diese Enzyme werden außer von Halogenidionen auch von anderen einwertigen Anionen aktiviert, allerdings in geringerem Maße. Eine Untersuchung beispielsweise der Effekte von NO_2^- , NO_3^- , ClO_3^- und J^- bei der AP I steht noch aus.

Eine Aktivierung des Enzyms durch Cl^- wurde schon von GRASSMANN (59) und SCHNEIDER (17-20) berichtet. Wie sie fanden, bewirkt der Zusatz von Cl^- eine Dipeptidaseaktivität, die sie vorher nicht beobachten konnten. GRASSMANN bezeichnete in diesem Zusammenhang die AP I als "APODIPEPTIDASE".

Wie wir feststellen konnten, spaltet das Enzym jedoch auch Dipeptide ohne Zusatz von Chlorid. Die Aktivierung des Enzyms durch Cl^- ist bei Dipeptiden und Tripeptiden gleichermaßen effektiv.

Wie bei der Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen (83), ist auch bei unserem Enzym die Metallaktivierung stark pH-abhängig. Das gleiche gilt für die Aktivierung durch Br^- . Bemerkenswerterweise ist die relative Aktivierung durch beide Aktivatoren unterhalb von pH 6 am größten, gerade in dem pH-Bereich, den man in den Hefevakuolen findet, wo sehr wahrscheinlich ein großer Teil des Enzyms in vivo lokalisiert ist. Dies läßt eine regulatorische Bedeutung der Aktivatoren vermuten.

Wie gesehen, ist der Mechanismus der Enzymaktivierung durch Zn^{2+} - und Halogenidionen noch nicht endgültig gelöst. Um weitere Informationen darüber zu erhalten, wäre es von Nutzen, wenn man die kinetischen Konstanten der Peptidhydrolysen bei verschiedenen pH-Werten bestimmen würde.

Wie die gleiche Intensitätsverteilung der Untereinheiten des

Enzyms bei pH 7,8 in Abwesenheit und Gegenwart der Aktivatoren beweist, ist die Aktivierung durch Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- nicht auf eine Umwandlung inaktiver Protomere in das aktive Oligomer zurückzuführen.

5.7.2. pH-Abhängigkeit des Enzyms, Einfluß von Aktivatoren

Wie bereits erwähnt (siehe 5.1.), lassen sich die in der Literatur angegebenen pH-Werte für die Aktivitätsoptima der enzymatischen Spaltung verschiedener Substrate nicht miteinander vergleichen, da die Meßmethoden unempfindlich und die Testbedingungen unterschiedlich waren. Hinzu kommt, daß die pH-Abhängigkeit des Enzyms durch mehrere Effekte beeinflusst wird.

a) Zunächst besteht die Aminopeptidase I aus Untereinheiten, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Wie die Dichtegradientenzentrifugationen und die Versuche zur Enzymstabilität beweisen, sind diese Gleichgewichtslagen stark pH-abhängig. Bei verschiedenen pH-Werten ist die Dissoziation des aktiven Enzyms in seine inaktiven Untereinheiten unterschiedlich, wobei die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung bei jedem pH anders ist und zudem noch durch die Aktivatoren Zn^{2+} und Br^- beeinflusst wird.

Die Experimente zur pH-Abhängigkeit der AP I wurden unter den gleichen Bedingungen wie die zur Hitzestabilität durchgeführt. Wie bereits in diesem Zusammenhang näher erläutert, ist die Konzentration des aktiven Enzyms unter den Versuchsbedingungen nicht bei allen pH-Werten gleich groß, wodurch auch hier eine Verfälschung der pH-Abhängigkeit auftritt. Der begangene Fehler läßt sich erst abschätzen, wenn man die genauen Geschwindigkeiten der Umwandlungen von aktivem Enzym in die Protomere kennt. Eine Bestimmung der spezifischen Aktivitäten hilft hier nicht weiter, da bei einer Proteinbestimmung auch das inaktive Protein erfaßt wird.

b) Eine starke Veränderung des pH-Profiles der AP I wird auch durch die Aktivatoren Zn^{2+} und Br^- herbeigeführt, die das Enzym bei den verschiedenen pH-Werte in unterschiedlichem

Maße aktivieren, wobei die Aktivierung noch konzentrationsabhängig ist.

Die gefundene pH-Abhängigkeit des Enzyms in Gegenwart von Zn^{2+} zeigt ein falsches Bild, da bei hohen pH-Werten die aktuelle Zink-Konzentration durch die Bildung von Zn^{2+} -Hydroxykomplexen erniedrigt wird. Zur Vermeidung dieses Effektes müßte man Puffer mit Metallchelatoren verwenden, deren Komplexbildungskonstanten für jeden pH bekannt sind.

c) Eine weitere Verfälschung der pH-Abhängigkeit kommt eventuell dadurch zustande, daß bei verschiedenen pH-Werten die aktuellen Substratkonzentrationen unterschiedlich sein können, falls das Enzym nur solche Substratmoleküle bindet und umsetzt, deren Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure protoniert ist, wobei der Grad der Protonierung vom pH des Testpuffers und vom pK-Wert des Substrates abhängig ist. Bei niedrigem pH ist das Substrat stärker protoniert als bei hohem, was zur Erhöhung der wirklichen Substratkonzentration führen könnte. Der umgekehrte Fall ist jedoch auch denkbar, wenn nämlich deprotonierte Substratmoleküle vom Enzym besser gebunden werden.

Bei gegebener Aktivatorkonzentration ist die Aktivierung der AP I aber von der Substratkonzentration abhängig, bei niedrigem $[\text{S}]$ ist der Grad der Aktivierung größer als bei hohem. Hier treten also zwei gegenläufige Effekte auf, Verringerung von $[\text{S}]$ je nach pH und Herabsetzung der Hydrolysegeschwindigkeit mit gleichzeitiger größerer relativer Aktivierung bei den niedrigeren Substratkonzentrationen.

Ob das Enzym wirklich nur protonierte oder deprotonierte Substratmoleküle bindet und damit die obigen Effekte wirksam werden, ist bisher noch nicht untersucht worden. Falls dies aber der Fall ist, könnte man die aktuelle Substratkonzentration mit Hilfe des pK-Wertes und der HENDERSON-HESSELBACH-Gleichung berechnen, was aber dennoch keinen Sinn hätte, da man dann zwar die wirklichen $[\text{S}]$ bei jedem pH kennt, aber nicht weiß, wie groß die Aktivierung bei gegebener Substratkonzentration ist.

d) Liegen beide Aktivatoren Zn^{2+} und Br^- vor, so kommt hin-

zu, daß sich diese in ihrer Wirkung noch beeinflussen, wobei dieser Effekt ebenfalls pH-abhängig ist.

Zur genauen Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Enzyms muß zunächst eine Methode gefunden werden, die garantiert, daß bei allen pH-Werten die gleiche Konzentration an aktivem Enzym vorliegt. Sodann müssen dazu die kinetischen Daten der Peptidhydrolysen bei unterschiedlichen Aktivatorkonzentrationen bestimmt werden. Miteinander vergleichbar wären im Endeffekt dann die bei den effektivsten Aktivatorkonzentrationen unter Berücksichtigung der aktuellen $[S]$ gemessenen kinetischen Konstanten.

Erst dann könnte man Aussagen machen über die natürliche pH-Abhängigkeit und den Einfluß von Protonierung und Deprotonierung geladener Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Durchführung dieser Experimente wird dadurch erschwert, daß das Enzym in Abwesenheit von Aktivatoren sehr wenig aktiv ist, in deren Gegenwart aber eine hohe Aktivität zeigt. Es ist daher schwierig, alle genannten kinetischen Messungen bei der gleichen Enzymkonzentration durchzuführen. Bei niedrigen AP I - Konzentrationen ist die Aktivität ohne Zn^{2+} und Br^- zu gering, bei hohen in Gegenwart der Aktivatoren zu groß, so daß man in beiden Fällen nur schlecht im Bereich der notwendigen Substratkonzentrationen messen kann.

5.7.3. Substratspezifität und Kinetik

Eine Anzahl von Aminosäureamiden, Aminosäureestern, Di-, Tri- und Tetrapeptide wurden als Substrate der AP I getestet und hinsichtlich ihrer Spaltstellen und relativen Hydrolysegeschwindigkeiten miteinander verglichen. Fast alle untersuchten Substanzen mit einer freien aminoendständigen L-Aminosäure (oder Glycin) werden von der Aminopeptidase I mit meßbarer Geschwindigkeit gespalten, wobei die Hydrolyse successiv vom Aminoende her erfolgt. Die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten sind jedoch recht unterschiedlich. Das beste bisher gefundene Substrat ist das Tripeptid Ala-Thr-Ala.

Substrate mit D-Aminosäuren in N-terminaler Stellung werden ebensowenig gespalten wie solche mit Prolin an der gleichen Stelle. Das Enzym besitzt also weder D-Aminopeptidase- noch Prolidaseaktivität. Ebenfalls nicht gespalten werden Substrate mit acetylierten α -aminoendständigen Aminogruppen.

Das Enzym ist der Gruppe der sogenannten Leucinaminopeptidasen zuzuordnen, da es wie diese Substrate mit Leucin oder anderen hydrophoben Aminosäuren in aminoendständiger Stellung bevorzugt (74). Peptide mit Glycin oder geladenen Aminosäuren in N-terminaler Stellung werden dagegen nur sehr schlecht gespalten.

Transamidaseaktivität wie sie HANSON und LASCH (173) bei der Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen fanden, zeigt unser Enzym nicht. Die Aminopeptidase I spaltet auch Aminosäureamide und Aminosäureester, beide mit etwa der gleichen Geschwindigkeit. Hierin unterscheidet sich das Enzym von anderen bekannten Leucinaminopeptidasen, deren Esteraseaktivität etwa nur 10% der Amidaseaktivität beträgt (74).

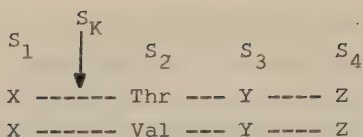
Wesentlich bessere Substrate als Aminosäureamide- oder Ester sind die entsprechenden Dipeptide (Leu-Gly wird von dem Enzym schneller gespalten als Leu-Amid) und Tripeptide und deren Derivate. Die Verlängerung der Peptidkette hat also im allgemeinen eine erhöhte Spaltungsgeschwindigkeit zur Folge. Auch die vom Aminoende her gesehene dritte Aminosäure übt noch einen großen Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit aus. Dies wird deutlich beim Vergleich der Tripeptide Leu-Gly-Gly und Leu-Gly-Leu, von denen das letztere, das wiederum eine große Seitenkette in der dritten Stelle aufweist, fast doppelt so schnell umgesetzt wird.

Auffallend ist zunächst die geringe Spaltungsgeschwindigkeit von Val-Gly-Gly im Vergleich zu Leu-Gly-Gly und Gly-Gly-Gly, was nicht so recht mit dem oben Gesagtem (Substrate mit hydrophoben aminoendständigen Aminosäuren werden am besten gespalten) übereinstimmt, da Valin hydrophober ist als Glycin. Das gleiche gilt auch für die entsprechenden Dipeptide, von denen Gly-Gly noch meßbar, Val-Gly und Val-Ala aber kaum noch angegriffen werden. Überraschenderweise wird auch das Dipeptid Thr-Ala nicht merklich gespalten, wohingegen das

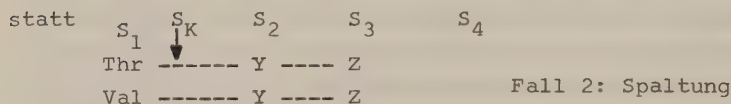
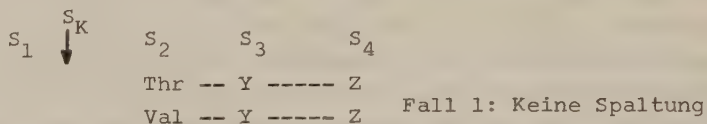
durch Kettenverlängerung erhaltene Tripeptid Ala-Thr-Ala das beste Substrat des Enzyms ist. Dieses Tripeptid wird etwa 6 mal schneller umgesetzt als Ala-Gly-Gly. Dies kann nicht darauf zurückzuführen sein, daß sich die beiden Substrate in der carboxylendständigen Aminosäure unterscheiden, da das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten bei dem Paar Leu-Gly-Gly/Leu-Gly-Leu nur etwa 1:2 ist, sondern muß in erster Linie durch den Ersatz der zweiten Aminosäure Glycin durch Threonin bewirkt werden. Auch Ala-Thr-Ala-OMe und Ala-Thr-Gly-OMe sind wesentlich bessere Substrate der AP I als Ala-Gly-Gly. Auch bei dem Dipeptid Ala-Gly macht sich der Ersatz der zweiten Aminosäure Glycin durch Threonin durch eine Verdoppelung der Spaltungsgeschwindigkeit bemerkbar. Das Enzym zeigt also geringe Reaktionsgeschwindigkeiten bei Substraten mit aminoendständigem Valin und Threonin und hohe, wenn die Position im Peptidsubstrat durch die Aminosäure Threonin besetzt ist. Durch genauere kinetische Untersuchungen stellt sich heraus, daß die K_M - Werte dieser Substrate sehr viel geringer sind und diese somit von dem Enzym besser gebunden werden als die entsprechenden Verbindungen ohne Threonin in zweiter Position. So betragen die Michaelis-Konstanten der Dipeptide Ala-Gly 40 mM und Ala-Thr 6 mM und die der Tripeptide Ala-Gly-Gly 12 mM und Ala-Thr-Ala 3,2 mM. Während sich die obigen Dipeptide in ihrer Affinität zum Enzym stark unterscheiden, sind ihre Maximalgeschwindigkeiten nahezu gleich mit 1,5 und 1,6 bezogen auf Ala-Gly-Gly, dessen $V_{Max} = 100$ gesetzt wurde.

Eine Erklärung für die ausgeprägte Sekundärspezifität der AP I wird gegeben durch die Annahme, daß das Enzym eine zweite Bindungsstelle (S_2) in Nachbarstellung zum katalytischen Zentrum (S_K) mit einer hohen Affinität zu Threonin und Valin aufweist, die in enge Wechselwirkung mit den Seitenketten dieser Aminosäuren tritt, sofern sie sich in zweiter Position im Substrat befinden.

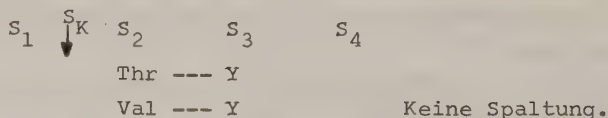
Daraus resultiert dann eine bessere (produktive) Bindung des Substrates:



Befinden sich Valin oder Threonin jedoch in anderen Positionen im Substrat, so ergeben sich daraus unproduktive Bindungen eben wegen der hohen Affinität der zweiten Bindungsstelle im Enzym zu diesen Aminosäuren, d.h., das Substrat wird in diesem Falle an der falschen, nicht zur Spaltung führenden Stelle gebunden:



Die Bindungsstelle im Enzym für die aminoendständige Aminosäure, die hydrophobe Aminosäuren bevorzugt, bindet, konkurriert also mit der Bindungsstelle für die Aminosäuren in zweiter Position, deren Affinität zu Valin und Threonin sehr hoch ist. Im Falle von Tripeptiden und Tetrapeptiden kommt noch der Einfluß von der dritten und vierten Substratbindungsstelle zur Geltung, durch deren Einfluß das Substrat doch teilweise an die richtige Stelle gelangt (siehe oben: Fall 2), wodurch solche Peptide noch gespalten werden. Dies ist jedoch bei Dipeptiden wegen der unterschiedlichen Affinitäten der Bindungsstellen S_1 und S_2 kaum möglich. Thr-Ala und Val-Gly bzw. Val-Ala können hauptsächlich nur auf folgende Weise gebunden werden:



Eine Spaltung dieser Dipeptide ist also durch die AP I nur sehr schlecht möglich. Thr-Ala ist ein sehr guter Inhibitor

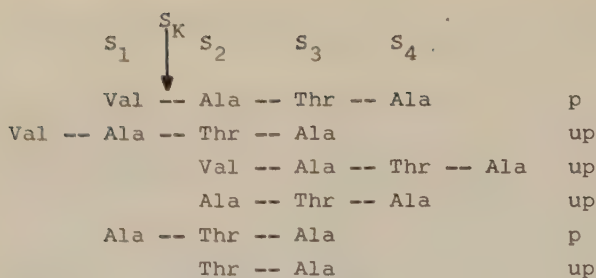
des Enzyms mit einem K_I von 1,6 mM für die Spaltung von Ala-Thr-Ala, dessen K_M doppelt so hoch ist.

Mit unserer Theorie der Bindungsstelle S_2 läßt sich auch erklären, warum Leu-p-Nitroanilid ein schlechtes Substrat des Enzyms ist, da der para-Nitroanilidrest sehr hydrophob ist und von S_2 nur sehr schlecht gebunden wird..

Alanin weist gegenüber Glycin noch eine Methylgruppe als Seitenrest auf, entspricht also anscheinend mehr Valin und Threonin, da Leu-Ala von dem Enzym etwa 3 mal besser gebunden wird als Leu-Gly.

Auch der niedrige K_M von Val-Ala-Thr-Ala läßt sich durch unsere Theorie erklären, da das Peptid beide von S_2 bevorzugte Aminosäuren enthält, was leicht zu der Bildung von 2 unproduktiven Enzym-Substrat-Komplexen führen sollte, wodurch sowohl die Michaelis-Konstante als auch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird. Das obige Tetrapeptid ist im Gegensatz zu dem Tripeptid Ala-Thr-Ala unserer Idee gemäß ein ziemlich schlechtes Substrat der AP I, das Dipeptid Thr-Ala, das als Endprodukt der enzymatischen Spaltung des Tetrapeptides auftritt ist ein kompetitiver Inhibitor, der sowohl die Hydrolyse des Tetra- als auch die des Tripeptides hemmt. Bei der obigen Reaktion kommt noch hinzu, daß das entstehende Tripeptid mit dem Tetrapeptid um das aktive Zentrum konkurriert und das Tetrapeptid selbst wiederum wegen seiner 2 zusätzlichen unproduktiven Bindungen an das Enzym als starker Inhibitor der Spaltung des Tripeptides fungiert. Dies macht sich in einer Anhäufung von Ala-Thr-Ala und der verzögerten Abspaltung von Alanin vom Tripeptid zu Beginn der Reaktion bemerkbar (siehe Abb.42). Würde das Tetrapeptid keinen kompetitiven Inhibitor darstellen, so dürfte eine solche Verzögerung nicht auftreten.

Nach unserer Theorie, die durch die Meßergebnisse bestätigt wird, ergeben sich bei der Hydrolyse des Tetrapeptides Val-Ala-Thr-Ala folgende Möglichkeiten für produktive (p) und unproduktive (up) Bindungen:



Interessant wäre die Klärung der Frage, wie sich Serin oder Methionin in zweiter Position an Stelle von Threonin in den entsprechenden Tri- und Tetrapeptiden verhalten würden, da Serin eine Hydroxylgruppe und Methionin eine Thioäthergruppierung aufweist.

Eine Untersuchung der Kinetik von Ala-Thr-X wäre bei Variation von X sehr aufschlußreich über die Affinität der dritten Substratbindungsstelle im Enzym.

Die von uns bei der AP I gefundene Sekundär- und Tertiärspezifität wurde auch schon von anderen Amino-peptidasen berichtet. So ist die Leucinamino-peptidase aus Schweinenieren 10 mal aktiver gegen Gly-Leu als gegen Gly-Gly (74). Eine 7,5-fache Aktivitätssteigerung ist bei der Amino-peptidase I aus E. coli zu verzeichnen, wenn man dem Enzym Met-Leu-Gly anbietet statt Met-Gly-Gly (88). In den beiden erwähnten Fällen erhöht also eine hydrophobe Aminosäure in zweiter Position die Reaktionsgeschwindigkeit.

Gründliche kinetische Studien zu der Sekundär- und Tertiärspezifität von Amino-peptidasen sind bisher nur wenige bekannt. SCHECHTER und BERGER (174) untersuchten anhand von 39 Peptiden (Dipeptiden bis Hexapeptide), die nur L- und D-Alanin in bekannten Positionen enthielten, den Einfluß von Aminosäuren, die in C-terminaler Nachbarstellung zu der Bindung stehen, die durch die Leucinamino-peptidase gespalten wird.

GARNER und BEHAL (115) fanden durch kinetische Messungen der Hemmung verschiedener Substrate durch mehrere Hemmstoffe, daß die Alaninamino-peptidase aus menschlicher Leber wenigstens

drei, wahrscheinlich aber vier Bindungsstellen für Aminosäureseitenreste im Peptidsubstrat im aktiven Zentrum aufweist.

Für die Aminopeptidase I aus Hefe muß man zunächst zwei Bindungsstellen für die N-terminale Aminosäure postulieren: Die erste für die freie α -Aminogruppe, da nur solche Peptidsubstrate umgesetzt werden, die zweite für den Seitenrest dieser Aminosäure (hydrophobe Aminosäuren in dieser Stellung sind bessere Substrate).

Eine dritte Bindungsstelle muß für die Bindung der vorletzten verantwortlich sein, da hier Valin und Threonin bevorzugt gebunden werden.

Schließlich muß man noch eine vierte Bindungsstelle für den Seitenrest der dritten Aminosäure im Peptidsubstrat vermuten, da auch hier wieder der Ersatz von Gly in Leu-Gly-Gly zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt.

In diesem Zusammenhang ist auch auffällig, daß Ala-Gly-Gly-OEt etwa doppelt so schnell von dem Enzym gespalten wird wie Ala-Gly-Gly. Durch die Veresterung erhält man statt einer freien polaren Carboxylgruppe die weit weniger polare Estergruppierung, was zur Steigerung der Reaktivität führt.

Genauere Untersuchungen zu dem Problem der Sekundär- und Tertiärspezifität müssen allerdings erst noch durchgeführt werden. Die Relevanz der obigen Hypothese ließe sich durch kinetische Messungen mit verschiedenen Peptidderivaten des Typs A-B-C-D bei Variation der einzelnen Aminosäuren überprüfen. Zusätzliche Informationen hierzu könnte man durch Bestimmung der Hemmtypen bei der Inhibierung der Spaltung von Aminosäurederivaten, von Di-, Tri- und Tetrapeptiden durch verschiedene Substratanaloge erhalten.

5.8. Chemische Modifizierung des Enzyms

Bei der chemischen Modifizierung des Enzyms kann durch 10 mM Jodacetamid keine Hemmung erzielt werden, N-Äthylmaleinimid hemmt erst in einer Konzentration von 16 mM. Dies beweist, daß das Enzym kein SH-Enzym ist.

Succinylierte AP I dissoziiert wegen der eingeführten negativen Ladungen (Bernsteinsäurerest!), die sich gegenseitig abstoßen, in die Untereinheiten, was die Dichtegradientenzentrifugationen der so behandelten AP I beweisen. Welche Aminosäuren mit diesem Reagenz reagiert haben, läßt sich ohne eine Durchführung von Aminosäureanalysen nicht sagen. Da die Protomere, die zum großen Teil durch die Succinylierung entstehen, inaktiv sind, kann man nicht feststellen, ob reaktive Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms von dem Reagenz erfaßt wurden.

Über die Art der Wirkung der anderen Modifizierungsreagentien und der Photooxidation kann man ebenfalls keine Aussage machen. Hier sind zusätzliche Experimente, bei denen Aktivitätsverlauf und Aminosäuregehalt des Enzyms korreliert werden müssen, durchzuführen. Dabei erschwert jedoch die Existenz der vielen inaktiven Untereinheiten die Durchführung und Auswertung dieser Versuche, da man die Konzentration des aktiven Enzyms kennen muß. Liegen neben dem Oligomer auch die inaktiven Protomere vor, so werden wahrscheinlich auch diese bei der chemischen Modifizierung erfaßt, wodurch Modifizierungsgrad und Aktivitätsverlust nur schwer in Einklang zu bringen sein werden.

Eine Möglichkeit hierzu besteht darin, daß man das aktive Enzym durch Dichtegradientenzentrifugation bei dem pH isoliert, bei dem auch das Modifizierungsexperiment durchgeführt werden soll.

6. ZUSAMMENFASSUNG

A) In der 50 - 70%-gen Ammoniumsulfatfällung des Hefe-autolysates von Bierhefe wurden vier Aminopeptidasen gefunden, die durch Gelfiltration an Sephadex G-150 getrennt werden konnten. Das Enzym mit dem höchsten Molekulargewicht (AP I), das für den größten Teil der Aminopeptidaseaktivität der Hefezelle verantwortlich ist, wurde auf zwei Wegen bis zur Homogenität bei einer 900-fachen Anreicherung gereinigt. Die beiden Methoden unterscheiden sich durch die Autolyse, die in einem Fall durch Papain beschleunigt wird, sowie eine Essigsäurefällung. Die weiteren wesentlichen Schritte der Reinigung sind Ammoniumsulfat- und Aceton-Fällungen, DEAE-Cellulose- und Sephadex-Chromatographie.

B) Eine weitere Aminopeptidase (AP II) mit einem Molekulargewicht von etwa 2×10^5 daltons wurde zusammen mit der Dipeptidase (63) angereichert. Dieses Enzym unterscheidet sich von der AP I hinsichtlich ihres Molekulargewichtes, ihrer Substratspezifität und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit.

C) Das von uns gereinigte Enzym ist mit der von JOHNSON 1941 aus Bierhefe isolierten Aminopeptidase sowie mit der von GRASSMANN 1928 dargestellten Aminopeptidase in Hinblick auf Untereinheitsstruktur, Molekulargewicht des aktiven Enzyms (600 000 daltons), Substratspezifität, elektrophoretischer Beweglichkeit und Aktivierbarkeit durch Zn^{2+} und Br^- bzw. Cl^- identisch.

D) Das aktive Enzym weist ein Molekulargewicht von 6×10^5 daltons mit einer Sedimentationskonstante von 20 S auf und ist aus 12 größenmäßig identischen Untereinheiten von je 50 000 daltons (3,5 S) aufgebaut. Neben diesen existieren noch weitere Protomere mit den Sedimentationskonstanten von ca. 2 S, 8,2 S, 12 S und 16,5 S. Von diesen ist nur die Form mit 16,5 S enzymatisch aktiv. Inaktiv sind auch die Dimeren, Trimeren und Tetrameren des aktiven Enzyms vom MG 600 000 daltons, die wie die Untereinheiten des Oligomeren auch bei

der Gelfiltration, Dichtegradientenzentrifugation sowie Disc-Elektrophorese zu beobachten sind.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Struktur des Oligomeren und dessen Polymere.

Die Dissoziation des aktiven Enzyms in die Untereinheiten ist pH- und konzentrationsabhängig. Die scheinbare Denaturierung des Enzyms bei pH-Werten unterhalb von 5 und oberhalb von 7 ist auf Dissoziation zurückzuführen. In diesem pH-Bereich läßt sich das Oligomer durch Zusatz von Zn^{2+} und Br^- unter Erhaltung der Aktivität stabilisieren.

E) Die AP I ist ein Glykoprotein mit einem Anteil von 12 Gewichtsprozenten Kohlenhydrat, der sich zu 95% aus neutralen Hexosen und zu 5% aus Hexosaminen zusammensetzt.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms beträgt 4,7.

AP I enthält $1,8 \pm 0,5$ g-Atome Zink pro Oligomer vom Molekulargewicht 600 000 daltons (Atomabsorptionsmessungen).

Das Enzym besitzt mehrere Zink-Bindungsstellen, die sich in ihrer Affinität zum Metall stark unterscheiden. EDTA-behandeltes Enzym läßt sich durch Zusatz von Zink aktivieren.

Neben Zn^{2+} kann nur Co^{2+} in geringem Maße eine Aktivitätssteigerung herbeiführen, während Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} und Cu^{2+} hemmen. Zn^{2+} erhöht die Maximalgeschwindigkeit V_{Max} , hat aber kaum einen Einfluß auf $K_{\text{M,app}}$ und den HILL-Koeffizienten n_{H} .

F) EDTA-behandeltes Enzym läßt sich ebenfalls durch Cl^- oder Br^- aktivieren, F^- wirkt hemmend, Natriumsulfat ist praktisch ohne Wirkung auf die Peptidaseaktivität. Bromid ist ein positiver allosterischer Effektor.

G) Die Aktivatoren Zn^{2+} und Cl^- bzw. Br^- müssen sich in noch ungeklärter Weise bei der Aktivierung des Enzyms beeinflussen. Die höchsten spezifischen Aktivitäten erhält man in Gegenwart von geringen Bromid- und hohen Zink-Konzentrationen oder mit kleinen Zn^{2+} - und hohen Br^- -Konzentrationen.

H) Die Aktivierung des Enzyms durch Zink oder Bromid sowie durch Zn^{2+} und Br^- ist pH-abhängig und beeinflusst das pH-Profil der AP I. In Abwesenheit von Aktivatoren findet

man bei der enzymatischen Spaltung von Leu-Gly-Gly ein Maximum bei pH 6,0-6,5, in deren Gegenwart ist dieses nach höheren pH-Werten verschoben (pH 7,8 - 8,0). Eine maximale Aktivierung ist bei pH 5,0 zu beobachten.

I) Die Aktivatoren Zink und Bromid haben eine unterschiedliche Wirkung auf die Hitzestabilität des Enzyms, die pH-abhängig ist. Während Zink einen guten Schutz vor der Hitzeinaktivierung bietet, hat Bromid allein keinen Einfluß. In Gegenwart von Zn^{2+} und Br^- ist das Maximum der Hitzestabilität vom sauren pH-Bereich (pH 6) in den alkalischen (pH 8,5) verschoben.

J) Die Aminopeptidase I weist mehrere (mindestens vier) Substratbindungsstellen im aktiven Zentrum auf. Es werden nur Peptide mit freier α -Aminogruppe umgesetzt, besonders gut solche mit hydrophoben N-terminalen Aminosäuren. Untersuchungen zur sekundären Spezifität mit verschiedenen Substraten zeigen, daß auch für die zweite und dritte Aminosäure Bindungsstellen vorhanden sind.

K) Bei der chemischen Modifizierung der AP I wurde keine Hemmung erreicht durch 1-H-Diazotetrazol, Jodacetamid und Tetranitromethan. Eine Inaktivierung ist mit Essigsäureanhydrid, Phenylmethylsulfonylfluorid, Diäthylpyrocarbonat und durch die Photooxidation des Enzyms zu erreichen. Durch Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid erfolgt die Dissoziation des Oligomeren in die inaktiven Protomere.

7. Literaturverzeichnis

- (1) JOHNSON, M.J. (1941), J. Biol. Chem. 137, 575-586
- (2) JOHNSON, M.J., und BERGER, J. (1942)
Advances in Enzymology (Nord, F.F. und Werkmann, Ch.,
Hrsg.) 2, 69-92, Interscience Publishers, INC. N.Y.
- (3) HARRIS, G. (1958) The Chem. and Biol. of Yeasts
(Cook, A.H. Hrsg.) S. 439-442
Academic Press, INC. Publishers, N.Y.
- (4) SMITH, E.L. (1951) The Enzymes (Summer, J.B. und
Myrbäck, K., Hrsg.) Vol. 1, Part 2, S. 793
Academic Press, N.Y.
- (5) SMITH, E.L. (1951) Advances in Enzymology
(Nord, F.F., Hrsg.) 12, S. 191-254,
Interscience Publishers, INC., N.Y.
- (6) HANSON, H. (1966) Hoppe-Seyler/Zhiefelders Handbuch
d. physiol.- und pathol.- chem. Analyse
(Lang, K. und Lehnartz, E., Hrsg.) 10. te Auflage,
Band 6, Teil C, S. 147-149
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, N.Y.
- (7) MASUDA, T., HAYASHI, R. und HATA, T. (1975)
Agr. Biol. Chem. 39, 499-505
- (8) WILLSTÄTTER, R. und GRASSMANN, W. (1926)
Z. Physiol. Chem. 153, 250-282
- (9) GRASSMANN, W. und HAAG, W. (1927)
Z. Physiol. Chem. 167, 188-201
- (10) GRASSMANN, W. (1927), Z. Physiol. Chem. 167, 202-220
- (11) GRASSMANN, W. und DYCKERHOFF, H. (1928),
Z. Physiol. Chem. 179, 41-78
- (12) GRASSMANN, W. und DYCKERHOFF, H. (1928),
Chem. Ber. 61, 656-670
- (13) WILLSTÄTTER, R. (1925), Naturw. 14, 937
- (14) BALLS, A.K. und KÖHLER, Fr. (1932),
Z. Physiol. Chem. 205, 157-170
- (15) BALLS, A.K. und KÖHLER, Fr. (1933),
Z. Physiol. Chem. 219, 128-137
- (16) GRASSMANN, W., EMDEN, L. und SCHNELLER, K. (1934),
Biochem. Z. 271, 216-228

- (17) SCHNEIDER, F. und GRAEFE, E. (1941),
Biochem. Z. 307, 216-228
- (18) SCHNEIDER, F. (1941), Biochem.Z. 307, 249-256
- (19) SCHNEIDER, F. (1941), Biochem.Z. 307, 414-426
- (20) SCHNEIDER, F. (1941), Biochem.Z. 308, 247-254
- (21) MATILE, P.H. und WIEMKEN, A. (1967),
Arch. Microbiol. 56, 148-155
- (22) MATILE, P.H. (1971), Planta (Berlin) 96, 43-53
- (23) DERBY, K.G. (1917), Biochem. Z. 81, 107-208
- (24) LENNEY, F.J. (1956), J. Biol. Chem. 221, 919-930
- (25) HECHT, M. und CIVIN, H. (1936),
J. Biol. Chem. 116, 477-485
- (26) LENNEY, J.F. und DALBEC, J.M. (1967),
Arch. Biochem. Biophys. 120, 42-48
- (27) LENNEY, J.F. und DALBEC, J.M. (1968),
Fed. Proc. 27, 788
- (28) LENNEY, J.F. und DALBEC, J.M. (1969),
Arch. Biochem. Biophys. 129, 407-409
- (29) HATA, T., HAYASHI, R. und DOI, E. (1967),
Agr. Biol. Chem. 31, 150-159
- (30) DOI, E., HAYASHI, R. und HATA, T. (1967),
Agr. Biol. Chem. 31, 160-169
- (31) HATA, T., HAYASHI, R. und DOI, E. (1967),
Agr. Biol. Chem. 31, 357-367
- (32) HAYASHI, R., OKA, Y., DOI, E. und HATA, T. (1968),
Agr. Biol. Chem. 32, 359-366
- (33) HAYASHI, R., OKA, Y., DOI, E. und HATA, T. (1968),
Agr. Biol. Chem. 32, 367-373
- (34) HAYASHI, R., OKA, Y. und HATA, T. (1969),
Agr. Biol. Chem. 33, 196-206
- (35) HAYASHI, R., AIBARA, S. und HATA, T. (1970),
Biochem. Biophys. Acta 212, 359, 361
- (36) HAYASHI, R., MOORE, S. und STEIN, W.H. (1973),
J. Biol. Chem. 248, 2296-2302
- (37) HAYASHI, R., MOORE, S. und STEIN, W.H. (1973),
J. Biol. Chem. 248, 8366-8369
- (38) KUHN, R.W., WALSH, K.A. und NEURATH, H. (1974),
Biochem. 13, 3871-3877

- (39) FERGUSON, A.R., KATSUNUMA, T., HOLZER, H. und BETZ, H.
(1973), Eur. J. Biochem. 32, 444-450
- (40) SAHEKI, T., MATSUDA, Y. und HOLZER, H. (1973),
Eur. J. Biochem. 42, 61-66
- (41) HASILIK, A. und HOLZER, H. (1973),
Biochem. Biophys. Res.-Commun. 53, 552-559
- (42) BETZ, H., HINZE, H. und HOLZER, H. (1974),
J. Biol. Chem. 249, 4515-4521
- (43) SCHÖTT, E. und HOLZER, H. (1974),
Eur. J. Biochem. 47, 325-332
- (44) SAHEKI, T. und HOLZER, H. (1975),
Biochem. Biophys. Acta 384, 203-214
- (45) HOLZER, H., BETZ, H. und EBNER, E.,
Current Topics in Cellular Regulation, im Druck
- (46) BUCHNER, E. und HAHN, H. (1897),
Chem. Ber. 30, 117-124
- (47) HAHN, H. und GERET, L. (1898),
Chem. Ber. 31, 200-217
- (48) VINES, H. (1903) in "Annals of Botany", 17, 237-248
- (49) DERNBY, K.G. (1917), Biochem. Z. 81, 107-208
- (50) WALDSCHMIDT-LEITZ, E. und HARDENECK, A. (1925),
Z. Physiol.Chem. 147, 286-308
- (51) WALDSCHMIDT-LEITZ, E. und HARDENECK, A. (1925),
Z. Physiol. Chem. 149, 203-230
- (52) TJEDER, A.T. (1966), Acta Chem.Scand. 20, 1442-1444
- (53) FELIX, F. und BROUILLET, N. (1956),
Biochem. Biophys. Acta 21, 303-308
- (54) FELIX, F. und BROUILLET, N. (1960),
Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 699- 708
- (55) FELIX, F. und BROUILLET, N. (1966),
Biochem. Biophys. Acta 122, 127-147
- (56) GRASSMANN, W. und KLENK, L. (1929),
Z. Physiol. Chem. 186, 26-49
- (57) GRASSMANN, W., DYCKERHOFF, H. und SCHOENEBECK, O.v.
(1929), Chem. Ber. 62, 1307-1310
- (58) GRASSMANN, W., KLENK, L. und PETERS-MAYR, T. (1935),
Biochem. Z. 280, 307-324
- (59) GRASSMANN, W. (1937), Angew. Chem. 50, 913

- (60) GRASSMANN, W., VOLMER, W. und WINDBICHLER, V. (1938),
Biochem. Z. 298, 8-15
- (61) SCHNEIDER, F. (1938), Biochem. Z. 298, 130-136
- (62) CORDONNIER, R. (1967), Ann. Nutr. Aliment. 21, B 247-
B 273
- (63) RÖHM, K.-H. (1974), Z. Physiol.Chem. 335, 675-686
- (64) RÖHM, K.-H. (1975), Z. Physiol.Chem. 356, 903-914
- (65) GOLDBERG, A.L. und DICE, J.F. (1974),
Ann. Rev. Biochem. 43, 835-869
- (66) SUSSMAN, A.J. und GILVARG, C. (1971),
Ann. Rev. Biochem. 40, 397-408
- (67) PAYNE, J.W. (1968), J. Biol. Chem. 243, 3395-3403
- (68) PLATT, T., MILLER, J.H. und WEBER, K. (1970),
Nature 228, 1154-1156
- (69) GOLDBERG, A.L. und ROWIT, J. (1975), Proc. II nd
International Symposium on Intracellular Protein
Catabolism, Ljubljana, Yugoslavia, im Druck
- (70) PINE, M.T. (1967), J. Bacteriol. 93, 1527-1533
- (71) LIVINGSTONE, D.M. und LEDER, P. (1969),
Biochem. 8, 435-443
- (72) LENNEY, F.J., MATILE, P.H., WIEMKEN, A., SCHELLEN-
BERG, M. und MEYER, J. (1974),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1378-1383
- (73) HIMMELHOCH, S.R. und PETERSON, E.A. (1968),
Biochem. 7, 2085-2092
- (74) HIMMELHOCH, S.R. (1969), Arch. Biochem.Biophys. 134,
597-602
- (75) DELANGE, R.J. und SMITH, E.L. (1971), The Enzymes
(Boyer, P.D., Hrsg.), Bd. 3, 3.te Auflage, S. 81-
118, Academic Press, N.Y.
- (76) HANSON, H. und LASCH, J. (1967),
Z. Physiol. Chem. 348, 1525-1539
- (77) HANSON, H., GLÄSSER, D., MANSSFELDT, H.-G. und
JOHN, M. (1967), Z. Physiol. Chem. 348, 689-704
- (78) KRETSCHMER, K. und HANSON, H. (1968),
Z. Physiol. Chem. 349, 831-845
- (79) FROHNE, H. und HANSON, H. (1969),
Z. Physiol. Chem. 350, 207-212

- (80) FROHNE, H. und HANSON, H. (1969),
Z. Physiol. Chem. 350, 213-222
- (81) FROHNE, M., MICHAEL, R., FITTKAU, S. und HANSON, H.
(1969), Z. Physiol. Chem. 350, 223-229
- (82) KETTMANN, K. und HANSON, H. (1970),
FEBS-Letters, 20, 17-20
- (83) MELBYE, S.W. und CARPENTER, F.H. (1971),
J. Biol. Chem. 246, 2459-2463
- (84) CARPENTER, F.H. und HARRINGTON, K.T. (1972),
J. Biol. Chem. 247, 5580-5586
- (85) CARPENTER, F.H. und VAHL, J.M. (1973),
J. Biol. Chem. 248, 294-304
- (86) LUDEWIG, M., FROHNE, M., MARQUARDT, I. und HANSON, H.
(1975), Eur. J. Biochem. 54, 155-162
- (87) THOMPSON, G.A. und CARPENTER, F.H. (1976),
J. Biol. Chem. 251, 53-60
- (88) VOGT, V.M. (1970), J. Biol. Chem. 245, 4760-4769
- (89) SCHWABE, C. (1969), Biochem. 8, 783-794
- (90) SCHWABE, C. (1969), Biochem. 8, 794-802
- (91) TSAI, C.S. und MATHESON, A.T. (1965),
Can. J. Biochem. 43, 1643-1652
- (92) MATHESON, A.T. und ROLLIN, F. (1970),
Can. J. Biochem. 48, 1181-1188
- (93) MATHESON, A.T. und ROLLIN, F. (1970),
Can. J. Biochem. 48, 1292-1296
- (94) PFLEIDERER, G. und CELLIERS, P.G. (1963),
Biochem. Z. 339, 186-189
- (95) PFLEIDERER, G., CELLIERS, P.G., STANULOVIC, M.,
WACHSMUTH, E.D., DESTERMANN, H. und BRAUNITZER, G.
(1964), Biochem. Z. 340, 552-564
- (96) WACHSMUTH, E.D., FRITZ, I. und PFLEIDERER, G. (1966),
Biochem. 5, 169-174
- (97) WACHSMUTH, E.D., FRITZ, I. und PFLEIDERER, G. (1966),
Biochem. 5, 175-182
- (98) WACHSMUTH, E.D. (1967), Biochem. Z. 346, 467-473
- (99) WACKER, H., LEHKY, P., FISCHER, E.H. und STEIN, E.A.
(1971), Helv. Chim. Acta 54, 473-485

- (100) FEMFERT, U. und PFLEIDERER, G. (1970),
FEBS-Letters 14, 89-91
- (101) LEHKY, P., LISOWSKI, J., WOLF, D.P., WACKER, H. und
STEIN, E.A. (1973),
Biochem. Biophys. Acta 321, 274-281
- (102) KESSLER, E. und YARON, A. (1973),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 405-412
- (103) ELLEMAN, T.C. (1974), Biochem. J. 141, 113-118
- (104) LEHMAN, K. und UHLIG, H. (1969),
Z. Physiol. Chem. 350, 99-104
- (105) HENNRICH, H., KLOCHOW, M., ORTH, H.-D., FEMFERT, U.,
CICHOCKI, I.P. und JANY, K. (1973),
Z. Physiol. Chem. 354, 1339-1346
- (106) FEMFERT, U. und CICHOCKI, I.P. (1973),
Z. Physiol. Chem. 354, 1529-1540
- (107) KOHLEMAINEN, L. und MIKOLA, J. (1971),
Arch. Biochem. Biophys. 145, 633-642
- (108) SMITH, E.E., KAUFMANN, J.T. und RUTENBURG, A. M.
(1965), J. Biol. Chem. 240, 1718-1721
- (109) BEHAL, F.J., KLEIN, R.A. und DAWSON, F.B. (1966),
Arch. Biochem. Biophys. 115, 545-554
- (110) BEHAL, F.J., LITTLE, G.H. und KLEIN, R.A. (1968),
Biochem. Biophys. Acta 178, 118-127
- (111) BEHAL, F.J. und STORY, M.N. (1969),
Arch. Biochem. Biophys. 131, 74-82
- (112) LITTLE, G.H. und BEHAL, F.J. (1971),
Biochem. Biophys. Acta 243, 312-320
- (113) STARNES, W.L. und BEHAL, F.J. (1974),
Biochem. 13, 3221-3227
- (114) GARNER, C.W. und BEHAL, F.J. (1974),
Biochem. 13, 3228-3233
- (115) GARNER, C.W. und BEHAL, F. J. (1975),
Biochem. 14, 3208-3212
- (116) GARNER, C.W. und BEHAL, F.J. (1975),
Biochem. 14, 5084-5087
- (117) MAROUX, S., LOUVARD, D. und BARATTI, J. (1973),
Biochem. Biophys. Acta 321, 282-295

- (118) RONCARI, G. und ZUBER, H. (1970), *Methods in Enzym.*
(Perlman, G.E. und Lorand, L., Hrsg.), Bd. XIX,
S. 544-552, Academic Press, N.Y., London
- (119) ZUBER, H. und RONCARI, G. (1967),
Angew. Chemie 79, 906-907
- (120) MOSER, P., RONCARI, G. und ZUBER, H. (1970),
Intern. J. Protein Res. 2 191
- (121) STOLL, E., HERMODSON, M.A., ERICSSON, L.H. und
ZUBER, H. (1972), *Biochem.* 11, 4731-4735
- (122) STOLL, E., ERICSSON, L.H. und ZUBER, H. (1973),
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3781-3784
- (123) MÄKINEN, K.K. (1968),
Arch. Biochem. Biophys. 126, 803- 811
- (124) HOPUSU-HAVU, V.K., MÄKINEN, K.K. und GLENNER, G.G.
(1966), *Nature* 212, 1271-1272
- (125) SIEPEN, D., YU, P.-H. und KULA, M.-R. (1975),
Eur. J. Biochem. 56, 271-281
- (126) SARID, S., BERGER, A. und KATCHALSKI, E. (1959),
J. Biol. Chem. 234, 1740-1746
- (127) SARID, S., BERGER, A. und KATCHALSKI, E. (1962),
J. Biol. Chem. 237, 2207- 2212
- (128) YARON, A. und BERGER, A. (1970), *Methods in Enzym.*
(Perlman, G.E. und Lorand, L., Hrsg.), Bd. XIX,
S. 521-534, Academic Press, N.Y., London
- (129) YARON, A. und MLYNAR, A. (1968),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 658-663
- (130) DOOLITTLE, R.F. und ARMENTROUT, R.W. (1968),
Biochem. 7, 516-521
- (131) SZEWSZAK, A. und MULCZK, M. (1969),
Eur. J. Biochem. 8, 63-67
- (132) ULIANA, J.A. und DOOLITTLE, R.F. (1969),
Arch. Biochem. Biophys. 131, 561-565
- (133) PLANTA, R.J. und GRUBER, M. (1964),
Biochem. Biophys. Acta 89, 503-510 und 511-519
- (134) METRIONE, R.M., ZEITMAN, B.B., REILLY, T.J. und
ELLIS, S. (1969),
J. Biol. Chem. 244, 2693-2709 und 6199- 6208

- (135) METRIONE, R.M., NEVES, A.G. und FRUTON, J.S. (1966),
Biochem. 5, 1597-1604
- (136) METRIONE, R.M., OKUDA, Y. und FAIRCLOUGH, G.F.
(1970), Biochem. 9, 2427-2432
- (137) VOYNICK, I.M. und FRUTON, J.S. (1968),
Biochem. 7, 40-44
- (138) GORTER, J. und GRUBER, M. (1970),
Biochem. Biophys. Acta 198, 546-555
- (139) MCDONALD, J.K., ZEIMAN, B.B., REILLY, T.S. und
ELLIS, S. (1966),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 771-775
- (140) BLOEHMENDAHL, H.
zitiert in MAURER, H.R., Disc-Elektrophorese,
S. 30-36, de Gruyter, Berlin (1968)
- (141) BREMER, M. ET AL. in E. STAHL: Dünnschichtchromato-
graphie, Springer Verlag, Heidelberg (1962)
- (142) REINDEL, F. und HOPPE, W. (1954),
Chem. Ber. 87, 1103-1107
- (143) PATAKI, G. (1963), J. Chromatographie 12, 541
- (144) SCHMITT, A. und SIEBERT, G. (1961),
Biochem. Z. 334, 96-107
- (145) Handbook of Biochemistry (1970), 2.te Auflage,
(Sober, H.A., Hrsg.) Seite J 234,
The Chem. Rubber CO., Cleveland, Ohio
- (146) TUPPY, H., WIESEBAUER, U. und WINTERBERGER, E. (1962),
Z. Physiol. Chem. 329, 278-288
- (147) Bedienungsanleitung zu BECKMANN Multichrom-B
Aminosäureanalysator
- (148) COHEN, S.R. und WILSON, I.B. (1966),
Biochem. 5, 904-909
- (149) MEANS, G.E. und FEENEY, R.E. (1971), Chemical Modi-
fication of Proteins, Holden Day, Inc. San Francisco,
London Amsterdam
- (150) HORINISHI, H., HACHAMORI, Y., KURIHARA, F. und SHIBATA,
K. (1964), Biochem. Biophys. Acta 86, 477- 489
- (151) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. (1942),
Biochem. Z. 310, 384-421

- (152) LEGGET BAILY, J. (1967), Techniques in Protein Chemistry, S. 341, Elsevier, Amsterdam
- (153) SPIRO, R.G. (1966), Methods in Enzymology (Neufeldt, E.F. und Ginsburg, V., Hrsg.), Vol. 8, S. 3-26, Acad. Press, N.Y.
- (154) GATT, R., BERMAN, E.R. (1966), Anal. Biochem. 15, 167-171
- (155) SVENNERHOLM, L. (1957), Biochem. Biophys. Acta 24, 604-611
- (156) MAURER, H.R. (1968), Disc-Elektrophorese, S.42, de Gruyter, Berlin
- (157) NACHLAS, M.M. zitiert in MAURER, H.R. (1968), Disc-Elektrophorese, S. 149, de Gruyter, Berlin
- (158) WEBER, K. und OSBORN, M. (1969), J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- (159) SPACKMANN, D.H., STEIN, W.H. und MOORE, S. (1958), Anal. Chem. 30, 1109-1206
- (160) HAMILTON, P.B. (1963), Anal. Chem. 35, 2055-2064
- (161) MATSUBARA, H. und SASAKI, R.M. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175-178
- (162) HIRS, C.H.W. (1967), Methods in Enzymology, (Hirs, C.H.W., Hrsg.) Vol 11, S. 59-62, Academic Press, N.Y.
- (163) MARTIN, R.G. und AMES, B.N. (1961), J. Biol. Chem. 236, 1372-1379
- (164) METZ, G., GÖBBER, F. und RÖHM, K.-H. (1975), Proc. of the II nd Inter. Symposium on Intracellular Protein catabolism, Ljubljana, im Druck
- (165) MARX, R., METZ, G. und RÖHM, K.-H., in Vorbereitung
- (166) SMITH, M.H. (1970), Handbook of Biochemistry (Sober, H.A., Hrsg.), S. C10 und C37, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio
- (167) CATHALA, G. und BRUNNEL, C. (1975), J. Biol. Chem. 250, 6046-6053
- (168) SYTKOWSKI, A.J. und VALLEE, B.L. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 344-348

- (169) WONG, F.-J. T. (1975), Kinetics in Enzyme Mechanism, 57-60, Acad. Press. London
- (170) GINSBURG, A. und STADTMAN, E.R. (1975), Subunit Enzymes, Vol 2, S. 43-82 (Ebner, K.E., Hrsg.) Marcel Becker, Inc., N.Y.
- (171) SHAPIRO, B.M. und GINSBURG, A. (1968), Biochem. 7, 2153-2167
- (172) MYRBÄCK, K. (1926), Z. Physiol. Chem. 159, 1-84
- (173) HANSON, H. und LASCH, J. (1967), Z. Physiol. Chem. 348, 1525-1539
- (174) SCHECHTER, J. und BERGER, A. (1966), Biochem. 5, 3371-3375
- (175) COHN, E.J. und EDSALL, J.T. (1943), Proteins, Amino Acids and Peptides, S. 372, Reinhold, N.Y.
- (176) GIBBONS, R.A. (1976), Glycoproteins (Gottschalk, A., Hrsg.), S. 61, Elsevier, Amsterdam
- (177) FELGENHAUER, K. zitiert in MAURER, H.R. (1968), Disc-Elektrophorese, S. 76, de Gruyter, Berlin

Lebenslauf

Am 29. Juli 1949 wurde ich in der Kreistadt Witzenhausen geboren und einige Wochen später auf den Namen Günter Metz getauft. Mein Vater - Karl Metz - war Hauptlokführer bei der Deutschen Bundesbahn, meine Mutter - Marie Metz, geb. Dippel - ist Schwesternhelferin.

1956 wurde ich in die Volksschule Walburg eingeschult. Vier Jahre später wechselte ich zum Freiherr-vom-Stein Gymnasium in Hess.-Lichtenau, wo ich 1968 das Abitur bestand. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Studium der Chemie an der Philipps - Universität in Marburg, wo ich im Dezember 1970 mein Vordiplom und im Januar 1974 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ablegte. Das Thema meiner Diplomarbeit war "Versuche zur Synthese des Imidazolylglycins".

Von März 1974 bis April 1976 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Philipps - Universität Marburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Fr. Schneider an meiner Dissertation über die Amino-peptidase I aus Bierhefe.

